



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Θέμα: Αυτοαντισώματα του ήπατος και αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος
σε ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση**

Τσούρης Ζήσης

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Δαρδιώτης Ευθύμιος, Επίκουρος Καθηγητής Νευρολογίας, Επιβλέπων
- Μπόγδανος Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας & Αυτοάνοσων Νοσημάτων
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη
Μοριακή Ιατρική

Λάρισα, Οκτώβριος, 2016



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
Liver autoantibodies and autoimmune liver diseases in patients with multiple sclerosis

By
Tsouris Zisis

Three-member Committee:

- Dardiotis Efthimios, Assistant Professor of Neurology, Supervisor
- Bogdanos Dimitrios, Associate Professor of Internal Medicine & Autoimmune Diseases
- Germanis Anastasios, Professor of Laboratory Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Medicine

Larisa, October, 2016

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (ΠΣ)	10
ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	10
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ	11
ΚΛΙΜΑΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ.....	13
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΠΣ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΗΠΑΤΟΣ.	21
4.1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ).....	21
4.1.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΗ.....	21
4.1.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΗ.....	21
4.1.3 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΗ.....	22
4.2. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (ΠΧΚ).....	25
4.2.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΠΧΚ	26
4.2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΠΧΚ.....	26
4.2.3. ΑΝΤΙΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (ΑΜΑ)	26
4.2.4. ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (ΑΝΑ) ΣΤΗΝ ΠΧΚ.....	28
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	30
ΑΣΘΕΝΕΙΣ	31
ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το Δρ.Δαρδιώτη Ευθύμιο, Επίκουρο Καθηγητή Νευρολογίας, και το Δρ.Μπόγδανο Δημήτριο, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων για την επίβλεψη, την καθοδήγηση και τη βοήθειά τους στην εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας. Επίσης το Δρ.Χατζηγεωργίου Γεώργιο, Καθηγητή Νευρολογίας για την προσωπική του μέριμνα και τη βοήθειά του για την ολοκλήρωση της εν λόγω εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συναδέλφους και φίλους του εργαστηρίου Νευροεπιστημών και του ΙΕΤΕΘ για την πολυποίκιλη βοήθεια και τη στήριξή τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ.Γερμενή Αναστάσιο, Καθηγητή Εργαστηριακής Ανοσολογίας και διευθυντή του Π.Μ.Σ., για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω σε αυτό.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολλαπλή σκλήρυνση (ΠΣ) είναι μία ανοσομεσολαβούμενη νόσος της οποίας το παθογνωμονικό χαρακτηριστικό είναι η στροφή του ανοσιακού συστήματος έναντι της μυελίνης του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Η ΠΣ αποτελεί τη συχνότερη απομυελινωτική νόσο και οι ηλικίες στις οποίες εμφανίζεται είναι μεταξύ 20 και 40 ετών. Η συχνότητα της νόσου διαφέρει σημαντικά παγκοσμίως μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών (από >100/100,000 πληθυσμού στη Β. Αμερική και στην Ευρώπη έως 2/100,000 πληθυσμού στην Ανατολική Ασία και στην Υπο-Σαχάρια Αφρική), ενώ η συχνότητα εμφάνισης στις γυναίκες είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με τους άντρες (2/1) [1]. Η ΠΣ καταλείπει σημαντικού βαθμού αναπηρία εντός 20-25 ετών από την έναρξή της στο 30% των ασθενών και διακρίνεται ανάλογα με την πορεία εξέλιξής της και το μοτίβο των υποτροπών σε τέσσερις τύπους 1) την υποτροπιάζουσα – διαλείπουσα, 2) τη δευτεροπαθή προϊούσα, 3) την πρωτοπαθή προϊούσα και 4) την προϊούσα υποτροπιάζουσα ΠΣ. Παρότι η νόσος αποτελεί τη σημαντικότερη αιτία αναπηρίας στη νεανική ηλικία, κλινικά είναι υπεύθυνη για πλήθος νευρολογικών εκδηλώσεων και έχει μεγάλη κοινωνικοοικονομική επίπτωση σε πολλές χώρες δεν έχει αναγνωριστεί με ακρίβεια έως και σήμερα κάποια συγκεκριμένη αιτία. Πιστεύεται ότι οφείλεται στο συνδυασμό γενετικής προδιάθεσης και περιβαλλοντικών παραγόντων που οδηγεί σε μία παθολογική ανοσιακά μεσολαβούμενη απάντηση με αποτέλεσμα την εστιακή καταστροφή της μυελίνης και των αξόνων και τις εστιακές φλεγμονώδεις διηθήσεις. Πολλά χαρακτηριστικά της νόσου αποτελούν ένδειξη υπέρ της αυτοάνοσης αρχής της νόσου. Τέτοια χαρακτηριστικά αποτελούν η πειραματική αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα [30-33], οι σύγχρονες θεραπείες που στρέφονται έναντι ανοσιακών κυττάρων με ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα [34,35] καθώς και η αναλογία μεταξύ των φύλων. Η μελέτη αυτή σκοπό έχει να διερευνήσει τη σχέση των αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος καθώς και τη συχνότητα εμφάνισης ηπατικών αυτοαντισωμάτων στην ΠΣ. Παρά το γεγονός ότι τα αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος, όπως η αυτοάνοση ηπατίτιδα, συναντώνται σπάνια σε ασθενείς με ΠΣ η ύπαρξή τους καθώς και η βλάβη του ηπατικού παρεγχύματος που προκαλούν είναι στοιχεία που πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψιν πριν από την έκθεση των ασθενών αυτών στις σύγχρονες ανοσοτροποποιητικές θεραπείες.

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disease. The main pathognomonic feature of MS is the shift of the immune system against the myelin of the central nervous system (CNS). MS is the most common demyelinating disease and it primarily affects patients between 20 and 40 years old. Worldwide the frequency of the disease varies considerably among geographical areas (from >100/100,000 people in the North America and Europe to 2/100,000 in East Asia and Sub-Saharan Africa), while the incidence in women is significantly greater than in men (2/1) [1]. MS leaves severe disability in 20-25 years from the onset in 30% of patients and it is distinguished depending on the course of evolution and the pattern of recurrence in four types 1) relapsing – remitting (RRMS), 2) the secondary progressive (SPMS), 3) primary progressive (PPMS) and 4) the progressive relapsing (PRMS) MS. Although the disease is the largest cause of disability in young age, clinically responsible for a number of neurological events and a high socio-economic impact in many countries, we have not yet recognized a particular cause. It is believed that the combination of genetic predisposition and environmental factors lead to a pathological immune-mediated response resulting in focal myelin and axonal damage and focal inflammatory infiltration. Many features of the disease indicate a hypothesis of autoimmunity. Such features are experimental autoimmune encephalomyelitis [30-33], modern therapies that turn against immune cells with very encouraging results [34,35] and the ratio between the sexes. This study aims to investigate the relationship the incidence of autoimmune liver diseases and liver autoantibodies in MS. Although autoimmune liver diseases such as autoimmune hepatitis, rarely occur in patients with MS, their presence and the hepatic damage caused are aspects that should be seriously taken into account before the exposure of these patients to modern immunomodulatory therapies.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ΠΣ περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Jean-Martin Charcot, καθηγητή του Πανεπιστημίου του Παρισιού. Το 1868, ο Charcot, ο οποίος αποκαλείται και ο “πατέρας της νευρολογίας” παρατήρησε, κατά την κλινική εξέταση ενός ασθενούς, ένα διαφορετικό είδος τρόμου που συνοδευόταν από αλλοίωση της ομιλίας και διαταραχές της οφθαλμοκινητικότητας. Μετά το θάνατό του ασθενούς, εξετάζοντας τον εγκέφαλό του ανακάλυψε τις χαρακτηριστικές αλλοιώσεις – “πλάκες” της ΠΣ. Έτσι ενώ του προκάλεσε ιδιαίτερη σύγχυση η άγνωστη αιτία της νόσου καθώς και η ανθεκτικότητά της στο σύνολο των θεραπευτικών ουσιών της εποχής, προχώρησε στην περιγραφή της νόσου και των εγκεφαλικών αλλοιώσεων που τη συνοδεύουν. Με βάση αυτές τις αλλοιώσεις χρησιμοποίησε τον όρο “sclérose en plaques” ή αλλιώς σκλήρυνση κατά πλάκας.

Στις τελευταίες δεκαετίες του 19^{ου} αιώνα έγινε κατανοητό πλέον στην ιατρική κοινότητα ότι η ΠΣ αποτελεί ξεχωριστή νοσολογική οντότητα. Έτσι, το 1921, στη συνάντηση της Ένωσης για την Έρευνα των Νευρικών και Ψυχικών Διαταραχών (Association for Research in Nervous and Mental Diseases – ARNMD) τέθηκαν οι βάσεις για τη σύγχρονη σκέψη στην έρευνα της ΠΣ και εγκαταλείφθηκαν οι ξεπερασμένες αντιλήψεις.

Στην ίδια συνάντηση αποφασίστηκε ότι δεν υπήρχε κάποια αδιαμφισβήτητη απόδειξη για μεταδοτικότητα της νόσου. Παρά το γεγονός αυτό έκτοτε συνεχίζουν να αναδύονται στη δημοσιότητα ισχυρισμοί για συσχέτιση λοιμώξεων, όπως οι σπειροχαίτες, σε ασθενείς με ΠΣ. Βέβαια ένα τέτοιο λοιμώδες μοντέλο προέλευσης της ΠΣ θα εξηγούσε σε ικανοποιητικό βαθμό τα επιδημιολογικά δεδομένα για τη γεωγραφική κατανομή της συχνότητας της νόσου και γι’ αυτό το λόγο ένα μεγάλο μέρος των ειδικών νευρολόγων παραμένει ανοιχτό στην ιδέα αυτή. Όπως για παράδειγμα ένα μεγάλο μέρος της σύγχρονης έρευνας έχει επικεντρωθεί στο ρόλο του ιού Epstein-Barr (EBV) στην έναρξη αλλά και στην πορεία της νόσου [1,2].

Παρά τις αναφορές στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, η κληρονομικότητα της νόσου μελετήθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1930 οπότε και πρωτοπαρουσιάστηκε η οικογενής κατανομή της νόσου σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. Έτσι, το 1980, έγινε η επιβεβαίωση της ύπαρξης γενετικών παραγόντων που επηρεάζουν την οικογενή κατανομή της νόσου [3].

Παράλληλα, η ανάπτυξη της απεικόνισης μέσω του μαγνητικού συντονισμού (Magnetic Resonance Imaging – MRI) αποτέλεσε βασικό σταθμό στην κατανόηση της νόσου καθώς ήταν πλέον δυνατή η παρακολούθηση των βλαβών του κεντρικού νευρικού συστήματος σε περιόδους που οι ασθενείς ήταν ασυμπτωματικοί [4].

Κατά την περίοδο 1950 – 1960 άρχισε να γίνεται ευρέως αποδεκτή η ανοσιακή βάση της νόσου. Η παραδοχή αυτή σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της μεθοδολογίας της έρευνας την ίδια περίοδο οδήγησε στις πρώτες κλινικές μελέτες που οδήγησαν σε θεραπείες με πραγματικό όφελος για τους ασθενείς με ΠΣ, όπως οι μελέτες για τα οφέλη από χορήγηση κορτικοστεροειδών [5]. Το

1979 δημοσιεύθηκαν οι κατευθυντήριες οδηγίες για τη διεξαγωγή κλινικών μελετών στην ΠΣ με αποτέλεσμα για πρώτη φορά την επιτυχημένη προβολή της αποτελεσματικότητας των ανοσοτροποποιητικών θεραπειών.



Εικόνα 1 - Σύγχρονη άποψη της πορείας της Πολλαπλής Σκλήρυνσης (Ανατύπωση από: Murray, T. J. (2009). *The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. Journal of the Neurological Sciences.*)

Ως αποτέλεσμα στις αρχές του 21^{ου} αιώνα διαμορφώθηκε η σύγχρονη αντίληψη ότι η ΠΣ είναι μία ανοσομεσολαβούμενη νόσος η οποία ενεργοποιείται από κάποιο άγνωστο γεγονός σε άτομα με προδιάθεση στη νόσο (Εικόνα 1). Στα άτομα αυτά η ανοσιακή απάντηση στρέφεται εναντίον της μυελίνης και οδηγεί στην καταστροφή των νευραξόνων. Σήμερα, λοιπόν, αναγνωρίζεται ευρέως η σημασία της νευραξονικής καταστροφής, η συνεχής ενεργότητα της νόσου χάρη στις σύγχρονες δυνατότητες απεικόνισης και η γενικευμένη παρά εστιακή προσβολή του νευρικού συστήματος.

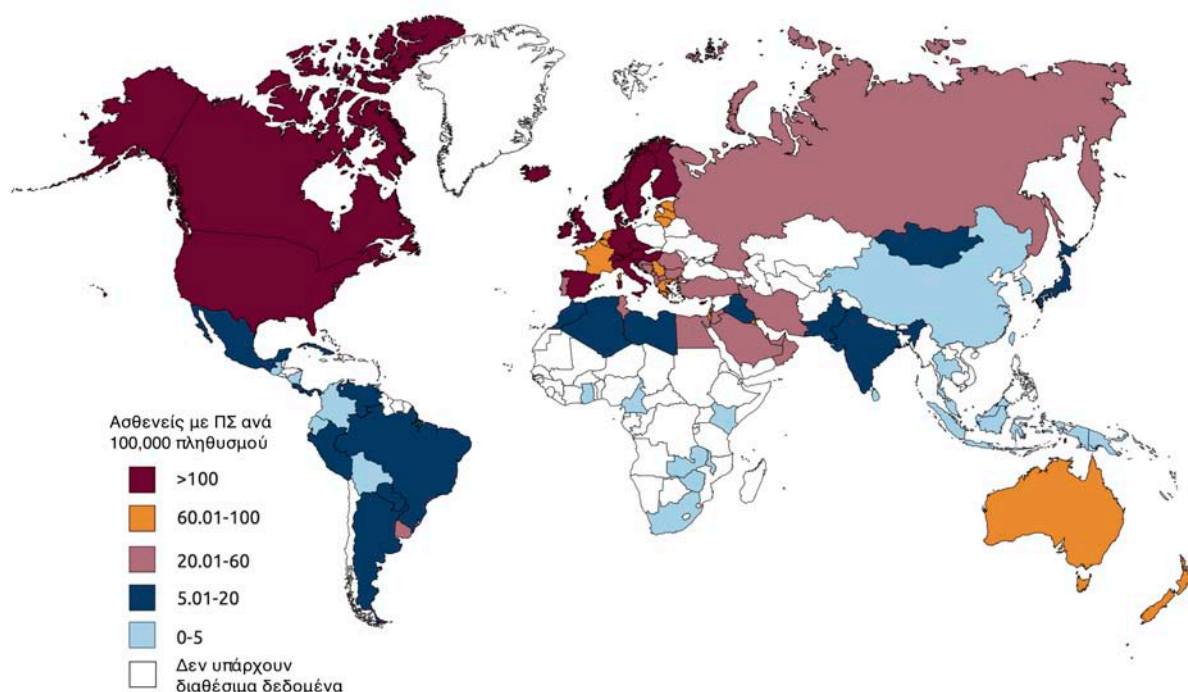
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΠΟΛΛΑΠΛΗ ΣΚΛΗΡΥΝΣΗ (ΠΣ)

Επιδημιολογία

Παγκοσμίως η ΠΣ είναι η πιο συχνή νευρολογική διαταραχή και σε πολλές χώρες αποτελεί την κυριότερη αιτία μη τραυματικής αναπηρίας στους νεαρούς ενήλικες με πολλές ατομικές αλλά και κοινωνικοοικονομικές επιπτώσεις [6]. Η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου είναι τα 30 έτη, μία ηλικία σταθμός για την εργασία και τον οικογενειακό προγραμματισμό. Υπολογίζεται ότι παγκοσμίως 2.5 εκατομμύρια άνθρωποι είναι προσβεβλημένοι από τη νόσο και το 50% αυτών θα παρουσιάσει αδυναμία βάδισης 25 έτη από την έναρξή της.

Επιπολασμός της ΠΣ ανά χώρα (2013)



Εικόνα 2 - Επιπολασμός της ΠΣ ανά χώρα (Ανατύπωση από: Msif. (2013). *Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World*. Multiple Sclerosis International Federation, 1–28.)

Χαρακτηριστικό είναι ότι ενώ η ΠΣ είναι παρούσα σε όλες τις περιοχές του κόσμου, ο επιπολασμός της νόσου διαφέρει σημαντικά (Εικόνα 2) με το μεγαλύτερο να καταγράφεται στην Ευρώπη και στη Β. Αμερική (108 και 140 ανά 100,000 γενικού πληθυσμού αντίστοιχα) και το χαμηλότερο στην Υπο-Σαχάρια Αφρική και στην Ανατολική Ασία (2.1 και 2.2 ανά 100,000 αντίστοιχα). Ακόμα ό μως και εντός των γεωγραφικών αυτών περιοχών παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στον επιπολασμό της ΠΣ, για παράδειγμα εντός της περιοχής της Ευρώπης ο επιπολασμός κυμαίνεται από τον υψηλότερο, 189 ασθενείς με ΠΣ ανά 100,000 στη Σουηδία έως

το χαμηλότερο, 22 ανά 100,000 στην Αλβανία. Στην Ελλάδα ο επιπολασμός της νόσου είναι από τους υψηλότερους της Ευρώπης μεταξύ 60 – 100 περιπτώσεις ΠΣ ανά 100,000 πληθυσμού.

Τέλος ένα άλλο χαρακτηριστικό της ΠΣ είναι η διπλάσια συχνότητα της νόσου στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες. Η ύπαρξη αυτής της σημαντικής διαφοράς μεταξύ των φύλων δεν είναι δυνατόν να κατανοηθεί πλήρως, ενώ αυτή η αναλογία φύλων βιβλιογραφικά συχνά εμφανίζεται στα αυτοάνοσα νοσήματα [7].

Κλινικές Εκδηλώσεις

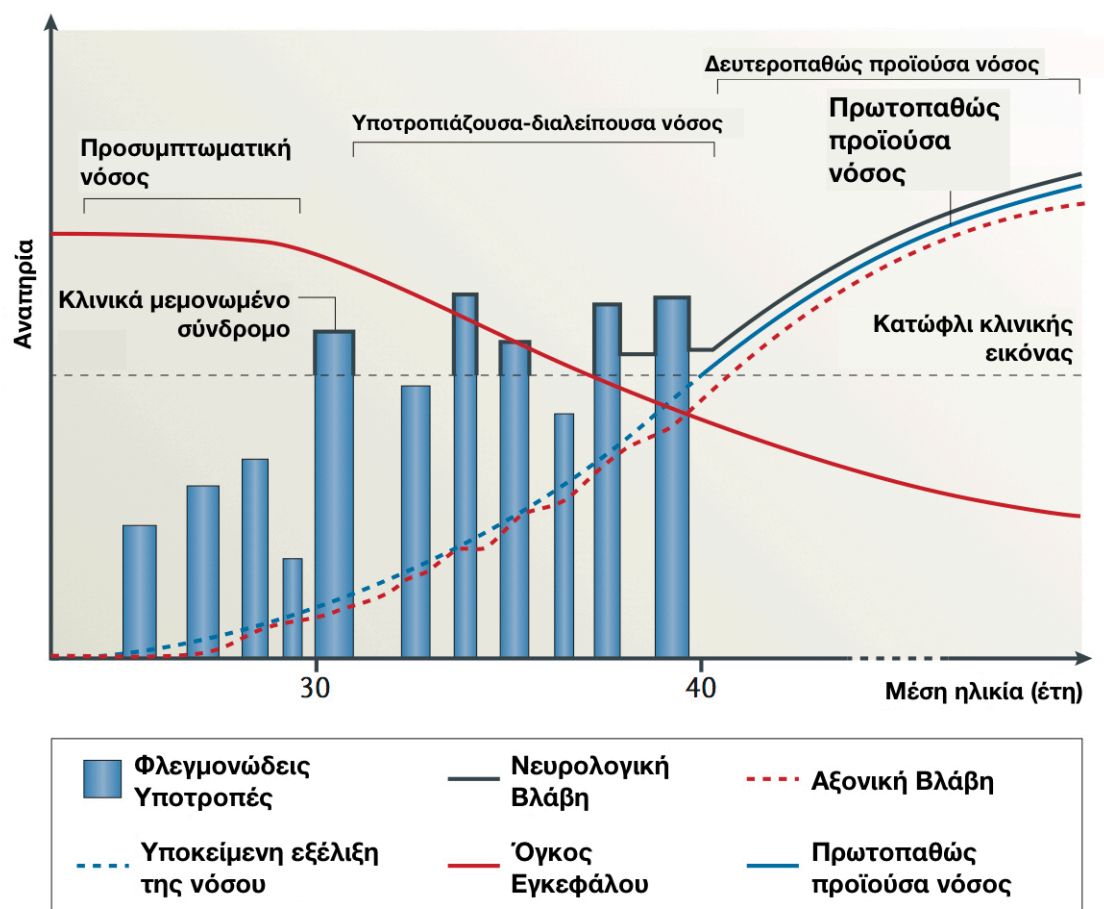
Η ετερογένεια αυτή της νόσου εμφανίζεται σε σημαντικό βαθμό και στην κλινική της πορεία και συμπτωματολογία. Στους περισσότερους ασθενείς οι κλινικές εκδηλώσεις ενός επεισοδίου (υποτροπή ή έξαρση) προέρχονται κυρίως από το κινητικό, το αισθητικό σύστημα, το σύστημα όρασης και το αυτόνομο αλλά πλήθος άλλων συμπτωμάτων μπορεί να εκδηλωθεί. Λίγα μόνο από αυτά τα συμπτώματα είναι χαρακτηριστικά της νόσου, όπως το σύμπτωμα του Lhermitte (μία αίσθηση ηλεκτρισμού που διατρέχει τη σπονδυλική στήλη ή τα άκρα κατά την κάμψη του αυχένα) και το φαινόμενο Uhthoff (παροδική επιδείνωση των συμπτωμάτων από αύξηση της θερμοκρασίας σώματος, όπως μετά την άσκηση και από ζεστό μπάνιο) [6].



Εικόνα 3- Οι υπότυποι της ΠΣ (Ανατύπωση από: Msif. (2013). *Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World*. Multiple Sclerosis International Federation, 1–28.)

Πολλές προσπάθειες για την ταξινόμηση των ασθενών σε ομάδες ανάλογα με την έναρξη και την πορεία της νόσου οδήγησαν στην αναγνώριση υποτύπων της νόσου[8]. Ο συχνότερος υπότυπος της νόσου είναι η υποτροπιάζουσα – διαλείπουσα ΠΣ (Relapsing – Remitting MS, RRMS) η οποία εμφανίζεται στο 85% των περιπτώσεων της νόσου με τη μορφή ενός επεισοδίου νευρολογικής βλάβης που χαρακτηρίζεται ως κλινικώς μεμονωμένο σύνδρομο (clinically isolated syndrome – CIS). Μετά το επεισόδιο αυτό ακολουθεί περίοδος ύφεσης της νόσου με κλινική αποκατάσταση των βλαβών. Στη συνέχεια η νόσος ακολουθεί επαναλαμβανόμενους κύκλους

υποτροπών – υφέσεων. Τελικά η αποκατάσταση των βλαβών μειώνεται κατά τις περιόδους ύφεσης ενώ παράλληλα εγκαθίσταται η όλο και αυξανόμενη αναπηρία.



Σχήμα 1 -Η πορεία της ΠΣ σε σχέση με τους υπότυπους της νόσου (Ανατύπωση από: Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545–558.)

Έτσι το 80% περίπου των ασθενών με υποτροπιάζουσα – διαλείπουσα ΠΣ θα μεταπέσει σε μία έως δύο δεκαετίες από τη διάγνωση στην δευτεροπαθώς προϊούσα ΠΣ (Secondary Progressive MS, SPMS) [9]. Σε αυτόν τον τύπο ΠΣ παύει πλέον να υπερισχύει το φλεγμονώδες στοιχείο της νόσου και έτσι η συνεχιζόμενη νευρολογική εκφύλιση συνοδεύεται τώρα πια από την ατροφία του ΚΝΣ τόσο σε εγκεφαλικό όγκο όσο και σε νευραξονική βλάβη. Ένα περίπου 10% των ατόμων με ΠΣ στερούνται τις παραπάνω υποτροπές και η νόσος από την έναρξή της έχει προϊούσα μορφή, αυτός ο υπότυπος της νόσου ονομάζεται πρωτοπαθώς προϊούσα ΠΣ (Primary Progressive MS, PPMS) (Σχήμα 1). Ένας ακόμα λιγότερο συνήθης υπότυπος της ΠΣ είναι η προϊούσα υποτροπιάζουσα ΠΣ (Progressive – Relapsing MS, PRMS) στην οποία ενώ υπάρχει σταθερή εκφύλιση του ΚΝΣ εμφανίζονται και υποτροπές της νόσου (Εικόνα 3).

Γίνεται, λοιπόν κατανοητό ότι τα συμπτώματα με τα οποία εμφανίζεται η νόσος είναι συχνά διαφορετικά για τον κάθε ασθενή. Σε κάποιους ασθενείς κυριαρχούν οι γνωσιακές διαταραχές, ενώ σε άλλους κύρια θέση κατέχει η αταξία, η ημιπάρεση ή παραπάρεση, η

κατάθλιψη ή τα συμπτώματα από την όραση. Σε κάθε περίπτωση όμως η επιδείνωση της σωματικής και γνωσιακής αναπηρίας στους ασθενείς με ΠΣ συνεχίζει παρά την απουσία υποτροπών.

Κλίμακες Κλινικής Εκτίμησης

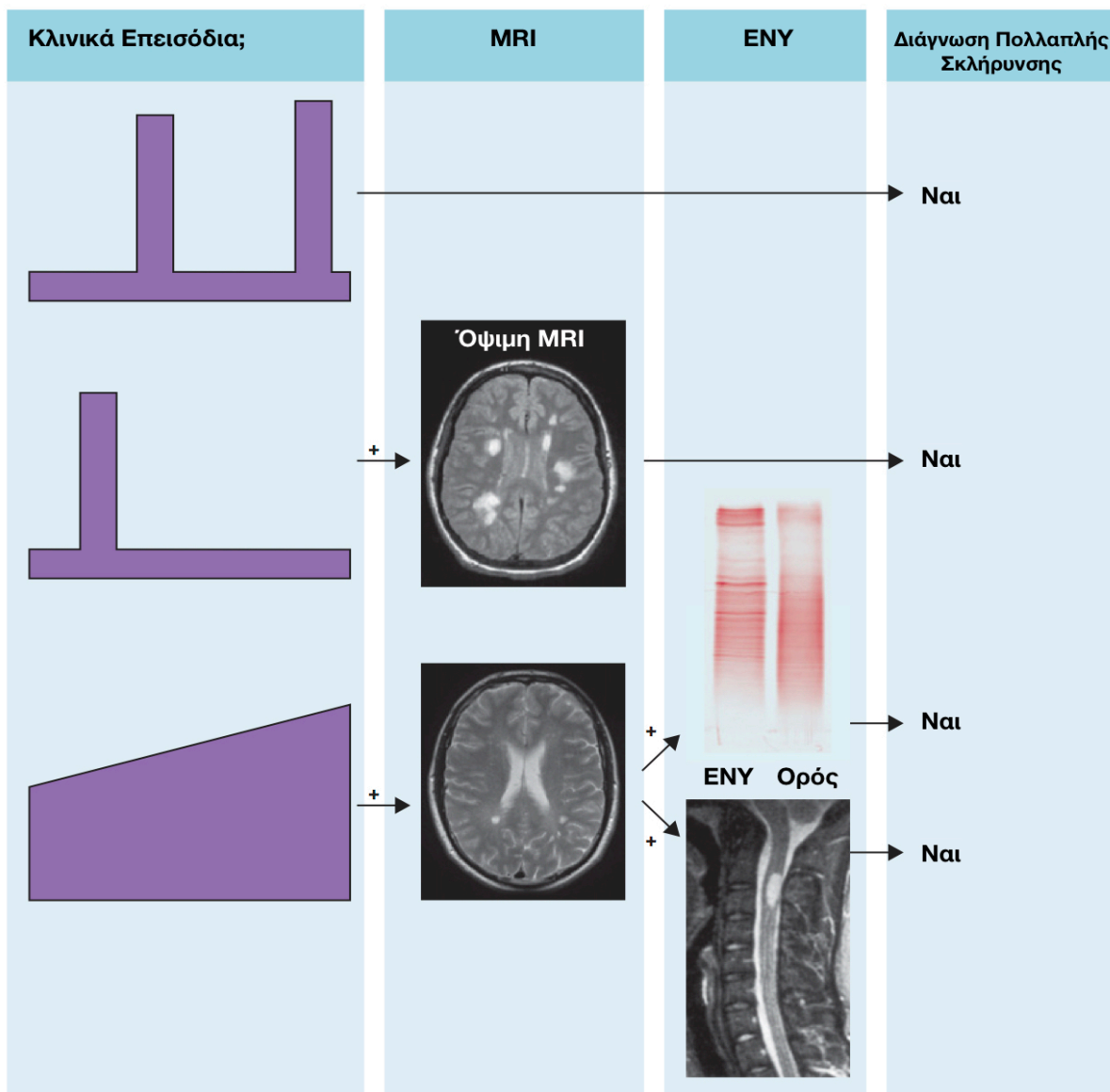
Όπως είναι αναμενόμενο αυτή η ετερογένεια των εκδηλώσεων της νόσου οδηγεί σε πολλές δυσκολίες στην κλινική εκτίμηση αυτών των ασθενών. Ο ασθενής με ΠΣ μπορεί να εκτιμηθεί με διάφορες κλίμακες αναπηρίας σύμφωνα με το ιστορικό και την κλινική εξέταση. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κλίμακα για την αξιολόγηση τους η κλίμακα 10 σημείων Kurtzke (Expanded Disability Status Scale – EDSS). Η κλίμακα EDSS αξιολογεί τη σοβαρότητα της αναπηρίας με βάση μία βαθμολογία από 0-10.

Διαγνωστική προσέγγιση

Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της ΠΣ είναι ότι τα συμπτωματικά επεισόδια χωρίζονται στο χώρο και στο χρόνο, αυτό σημαίνει ότι τα επεισόδια απέχουν μήνες ή και χρόνια μεταξύ τους και επηρεάζουν διαφορετικές ανατομικές περιοχές. Για τη διάγνωση της ΠΣ σήμερα χρησιμοποιούνται τα διαγνωστικά κριτήρια McDonald τα οποία περιλαμβάνουν κλινικές, απεικονιστικές και εργαστηριακές δοκιμασίες με κύριο στόχο την απόδειξη της διασποράς των βλαβών στο χώρο (Dissemination In Space – DIS) και στο χρόνο (Dissemination In Time – DIT) [Error! Bookmark not defined.]. Τα κριτήρια McDonald αναπτύχθηκαν το 2001 και αναθεωρήθηκαν το 2005 και 2010 [10-12].

Σημαντική στη διάγνωση της νόσου είναι η χρήση της MRI η οποία μπορεί να υποστηρίξει, να συμπληρώσει ή ακόμα και να αντικαταστήσει κάποια κλινικά κριτήρια. Τα κριτήρια McDonald δίνουν ιδιαίτερη έμφαση στο ρόλο της MRI και έχουν οδηγήσει στην δυνατότητα διάγνωσης της ΠΣ νωρίτερα και με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία [13], ακόμα και στη διάγνωση μετά από

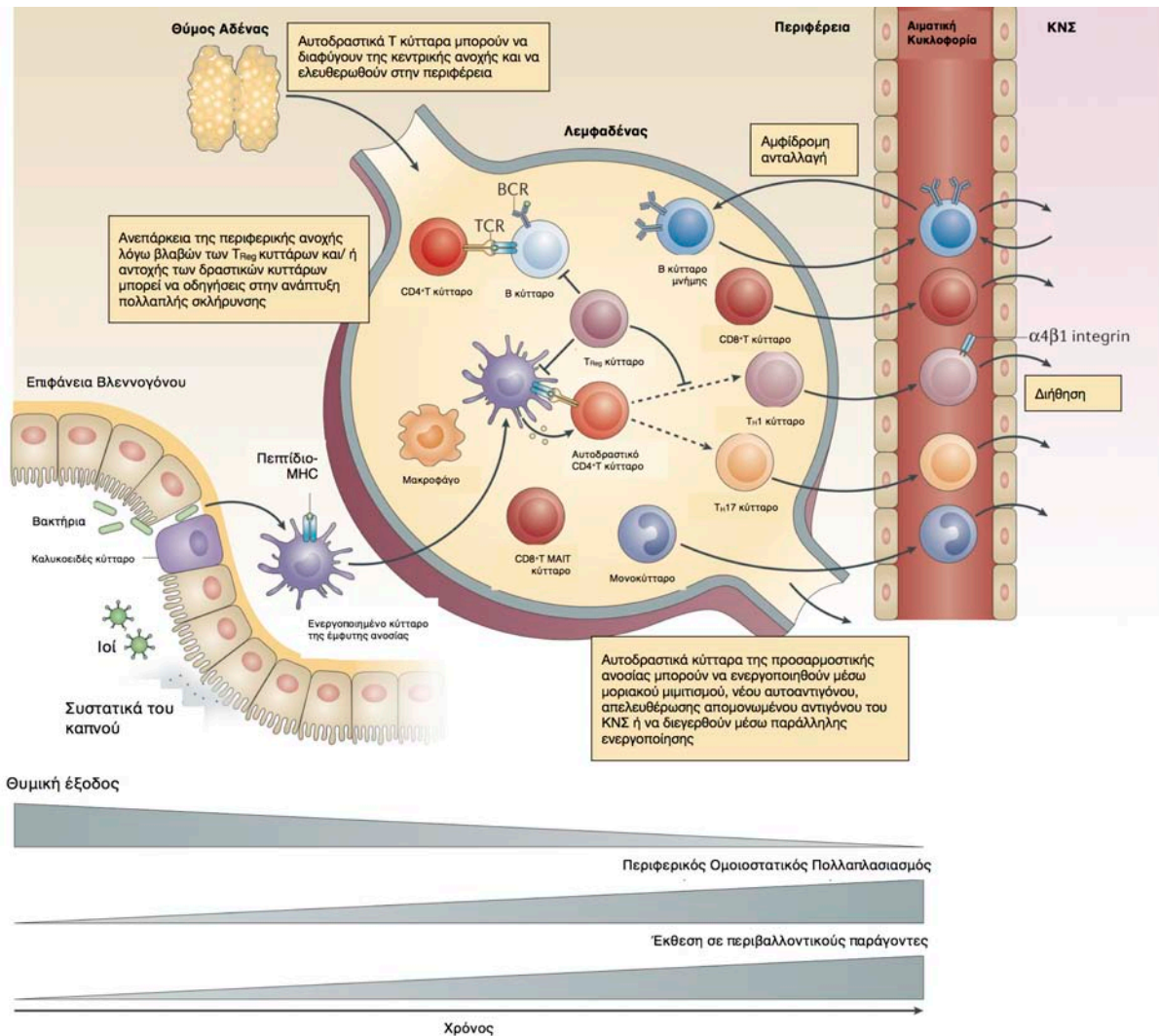
ένα κλινικό επεισόδιο (Εικόνα 4). Ως αποτέλεσμα επιτρέπεται η πρόωπη έναρξη θεραπείας και η βελτιωμένη συμβουλευτική των ασθενών.



Εικόνα 4- Κριτήρια για τη διάγνωση της ΠΣ: Μετατροπή από τα κριτήρια McDonald [Error! Bookmark not defined.]. Σκοπός είναι η απόδειξη ότι οι βλάβες διασπείρονται στο χώρο (DIS) και στο χρόνο (DIT) – πχ, επεισόδια που αφορούν διαφορετικές περιοχές του ΚΝΣ και εμφανίζονται με διαφορά τουλάχιστον 30 ημερών. Η MRI μπορεί να αντικαταστήσει ένα από αυτά τα επεισόδια. Στην MRI η διασπορά στο χρόνο απαιτεί: (1) μία νέα T2 και/ ή με πρόσληψη γαδολινίου βλάβη στην MRI παρακολούθησης με αναφορά σε μία αρχική απεικόνιση και σε διαφορετικό χρόνο αυτής ή (2) Ταυτόχρονη παρουσία, σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή, ασυμπτωματικών βλαβών που προσλαμβάνουν και βλαβών που δεν προσλαμβάνουν γαδολίνιο. Η διασπορά στο χώρο απαιτεί μία ή περισσότερες βλάβες T2 σε τουλάχιστον 2 από τις 4 περιοχές του ΚΝΣ: (1) περικοιλιακά, (2) υποφλοιωδώς, (3) υποσκηνιδιακά, (4) στο νωτιαίο μυελό. Για τη διάγνωση της PPMS απαιτείται: (1) πρόοδος της νόσου για ένα έτος και (2) να ισχύουν 2 από τα 3: (α) DIS με ≥ 1 T2 βλάβες σε τουλάχιστον μία χαρακτηριστική περιοχή του εγκεφάλου, (β) DIS στο νωτιαίο μυελό με ≥ 2 T2 βλάβες, (γ) εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) θετικό για ολιγοκλωνικές ζώνες. (Ανατύπωση και μετάφραση από: Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* (London, England), 372(9648), 1502–17.)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 - ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ

Η νόσος πιστεύεται ότι εκδηλώνεται σε άτομα με γενετικό υπόβαθρο μέσω προδιαθεσικών περιβαλλοντικών παραγόντων. Η αιτία ή το κύριο γεγονός που οδηγεί στην έναρξη της νόσου παραμένουν άγνωστα. Οι μη γενετικοί παράγοντες φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη συμμετοχή στη νόσο από τους γενετικούς [14,15]. Όμως η δυσκολία στην κατανόηση των σύνθετων επιδημιολογικών δεδομένων έχει ως αποτέλεσμα τη μικρή πρόοδο στην έρευνα για τη διερεύνηση των περιβαλλοντικών παραγόντων που οδηγούν στη νόσο.



Εικόνα 5- Εκτός του ΚΝΣ απορρύθμιση του ανοσιακού συστήματος. Η κεντρική ανοχή στο θύμο επιτελείται με την καταστροφή των αυτοδραστικών Τ κυττάρων. Επειδή πρόκειται για μία ατελή διαδικασία μερικά αυτοδραστικά Τ κύτταρα απελευθερώνονται στην περιφέρεια. Στους υγιείς η περιφερική ανοχή ελέγχει τα κύτταρα αυτά. Αν υπάρχει ελάττωμα σε αυτή την ανοχή, όπως μειωμένη λειτουργικότητα των T_{Reg} (ρυθμιστικών) κυττάρων και/ή αυξημένη ανοχή των δραστικών Β και Τ κυττάρων στους κατασταλτικούς μηχανισμούς, τότε αυτοδραστικά Β και Τ κύτταρα στην περιφέρεια με στόχο το ΚΝΣ μπορούν να μετατραπούν σε επιθετικά δραστικά κύτταρα μέσω του μοριακού μιμιτισμού, της παρουσίας νέου αυτοαντιγόνου, της αναγνώρισης απομονωμένων αντιγόνων του ΚΝΣ στην περιφέρεια ή από παράλληλη ενεργοποίηση. Γενετικοί καθώς και περιβαλλοντικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων και των μολυσματικών παραγόντων και των συστατικών του καπνού, συμβάλουν σε αυτά τα γεγονότα. Μόλις ενεργοποιηθούν, τα CD8⁺ T κύτταρα, τα διαφοροποιημένα CD4⁺ T βοηθητικά (T_H1) και T_H17 κύτταρα, τα Β κύτταρα και τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας μπορούν να διηθήσουν το ΚΝΣ οδηγώντας σε φλεγμονή και ιστική βλάβη. Επιπλέον τα Β κύτταρα μπορούν κυκλοφορώντας εκτός του ΚΝΣ να υποστούν ωρίμανση συγγένειας στους λεμφαδένες με αποτέλεσμα την περαιτέρω βλάβη του ΚΝΣ. Τα βέλη με διακεκομμένη διαγράμμιση υποδεικνύουν διαφοροποίηση. BCR: B cell receptor (υποδοχέας Β κυττάρων), CD8⁺ MAIT κύτταρο: CD8⁺ mucosa-associated invariant (βλεννογόνο-συνδεδεμένο αδιαφοροποίητο) Τ κύτταρο, TCR: T cell receptor (υποδοχέας Τ κυττάρων). (Ανατύπωση και μετάφραση από: Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545-558.)

Αυτή η έλλειψη ενός συγκεκριμένου εξωγενούς παράγοντα οδηγεί στο ερώτημα αν η έναρξη της ΠΣ λαμβάνει χώρα στην περιφέρεια ή στο ΚΝΣ. Στο “περιφερικό” μοντέλο της νόσου πιστεύεται ότι αυτοδραστικά Τ κύτταρα, που ενεργοποιούνται μέσω του μοριακού μιμιτισμού [15-17], της παράλληλης (bystander) ενεργοποίησης ή της συνέκφρασης Τ υποδοχέων (TCR) με διαφορετική εξειδίκευση [18], συγκεντρώνονται στο ΚΝΣ με συνοδεία ενεργοποιημένων Β κυττάρων και μονοκυττάρων (Εικόνα 5). Το μοντέλο αυτό είναι αντίστοιχο με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται για την πρόκληση της πειραματικής αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis – EAE) στα πειραματόζωα¹.

Σύμφωνα με το “κεντρικό” μοντέλο γεγονότα εντός του ΚΝΣ μπορούν να προκαλέσουν τη νόσο με τη διήθηση αυτοδραστικών λεμφοκυττάρων να συμβαίνει σε δεύτερο χρόνο. Τα γεγονότα αυτά δεν είναι ακριβώς προσδιορισμένα αλλά οι πιθανοί μηχανισμοί βασίζονται κυρίως σε άγνωστες ιογενείς λοιμώξεις του ΚΝΣ [19,20]. Η βάση αυτών των μηχανισμών είναι κυρίως η ανοσοεπιτήρηση του ΚΝΣ ή η πρωτοπαθής νευροεκφύλιση, όπως στην νόσο του Alzheimer και του Parkinson [21].

Πολλές γενετικές περιοχές, πάνω από 100, έχουν αναγνωριστεί ότι σχετίζονται με την ΠΣ. Η πλειονότητα αυτών των περιοχών αφορά γονίδια του ανοσιακού με αποτέλεσμα να υπάρχει αλληλεπικάλυψη των περιοχών του γονιδιώματος που αφορούν την ΠΣ με αυτές που σχετίζονται με διάφορα άλλα αυτοάνοσα νοσήματα [22]. Αυτό αποτελεί μία ενίσχυση του “περιφερικού” μοντέλου. Όμως δεν πρόκειται πάντα για μία απλή αλληλεπικάλυψη, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του TNFR1 που ενώ προδιαθέτει στην εμφάνιση της ΠΣ παράλληλα προάγει προστασία έναντι της αγκυλοποιητικής σπονδυλίτιδας [23]. Για να γίνει καλύτερη ερμηνεία αυτών των πολύπλοκων σχέσεων σήμερα χρησιμοποιούνται τα δίκτυα ενδοκυττάρων αλληλεπιδράσεων που σχηματίζονται από τη χρήση των γονιδίων της σχετικής περιοχής (Interactome Networks) [24]. Ο σχηματισμός τέτοιων δικτύων στην ΠΣ εμπλέκει τη σηματοδότηση της ιντερλευκίνης-2 (IL-2), των ιντερφερονών (IFN) και του πυρηνικού παράγοντα – κΒ σε άτομα με προδιάθεση [25]. Αναλύσεις επιγενετικής [26,27] και ανοσιακού προφίλ [28] έχουν αρχίσει να ερμηνεύουν τις διαφορές στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Έως σήμερα, πιο καθορισμένα μονοπάτια της νόσου έχουν περιγραφεί μόνο για λίγους γενετικούς

¹ Αντιγόνο του ΚΝΣ χορηγείται μαζί με ανοσοδιεγέρτες με αποτέλεσμα τη δημιουργία παθογονικών $CD4^+T$ βοηθητικών 1 (T_H1) κυττάρων και T_H17 κυττάρων στους λεμφαδένες. Στη συνέχεια εισέρχονται στην κυκλοφορία και δραστηριοποιούνται στο ΚΝΣ αφού διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB) στο χοριοειδές πλέγμα (Gijbels K. et al., 2000)

τόπους, όπως ο HLA-A*02:01 και ο HLA-DRB*15:01 καθώς και γονίδια που κωδικοποιούν τις α-αλυσούς των υποδοχέων της IL-2 και της IL-7 (IL-2Rα και IL-7Rα αντίστοιχα).

Με τον ίδιο τρόπο σκέψης αναγνωρίζεται μία πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων που σε άτομα με παράγοντες γενετικής προδιάθεσης της νόσου μπορούν να οδηγήσουν σε αυτοδραστικότητα ή να μεταβάλουν το κατώφλι ενεργοποίησης των κυττάρων του ανοσιακού συστήματος. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες πιθανόν μικροβιακοί ή υικοί μπορούν να ενεργοποιούν τα αυτοδραστικά Τ κύτταρα μέσω του μοριακού μιμιτισμού [15-16]. Εναλλακτικά ορισμένοι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν έμμεσα να μεταβάλουν το κατώφλι ενεργοποίησης των αυτοδραστικών Τ-κυττάρων μέσω της δημιουργίας ενός προφλεγμονώδους περιβάλλοντος. Έτσι μεσολαβητές της φλεγμονής μπορούν να δράσουν άμεσα στο ΚΝΣ με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κυττάρων της μικρογλοίας. Αυτό με τη σειρά του ενισχύει το σενάριο ότι η ΠΣ επάγεται από κάποια περιφερική φλεγμονή που οδηγεί σε νευροεκφύλιση χωρίς την ανάγκη πρόκλησης αυτοάνοσης απάντησης εντός του ΚΝΣ. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που θεωρείται σήμερα ότι εμπλέκονται στην παθογένεση της ΠΣ είναι η βιταμίνη D [15], η λοίμωξη από ανθρώπινο κυτταρομεγαλοϊό (CMV) και οι διαταραχές του κικάρδιου ρυθμού [29], ενώ οι καλύτερα τεκμηριωμένοι παράγοντες είναι το κάπνισμα και η λοίμωξη από τον ιό Epstein-Barr (EBV).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 - ΠΣ ΚΑΙ ΑΛΛΑ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Η πιο ευρέως αποδεκτή υπόθεση για την παθογένεση της ΠΣ είναι ότι κατά κύριο λόγο πρόκειται για μια αυτοάνοση ασθένεια. Αυτή η ιδέα ενισχύθηκε μετά από παρατηρήσεις σε πειραματόζωα σχετικά με την εμφάνιση αυτοάνοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΕΑΕ) στα τέλη του 1960 και στις αρχές του 1970 [30-33]. Έχει επανειλημμένως αποδειχθεί ότι η ΕΑΕ είναι μία αυτοάνοση διαταραχή που προκαλείται από Τ-κύτταρα τα οποία είναι ευαισθητοποιημένα για διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην δομή της μυελίνης ικανά να επάγουν εγκεφαλομυελίτιδα. Η υπόθεση υποστηρίζεται περαιτέρω και από σημαντικές ενδείξεις, όπως η παρουσία αυξημένων λεμφοκυττάρων, μακροφάγων, και μικρογλοιακών κυττάρων σε βλάβες ΠΣ, η ισχυρή γενετική συσχέτιση με γονίδια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) καθώς και η ικανοποιητική ανταπόκριση και αποτελεσματικότητα των νέων θεραπειών που στοχεύουν την ανοσιακή απόκριση [33]

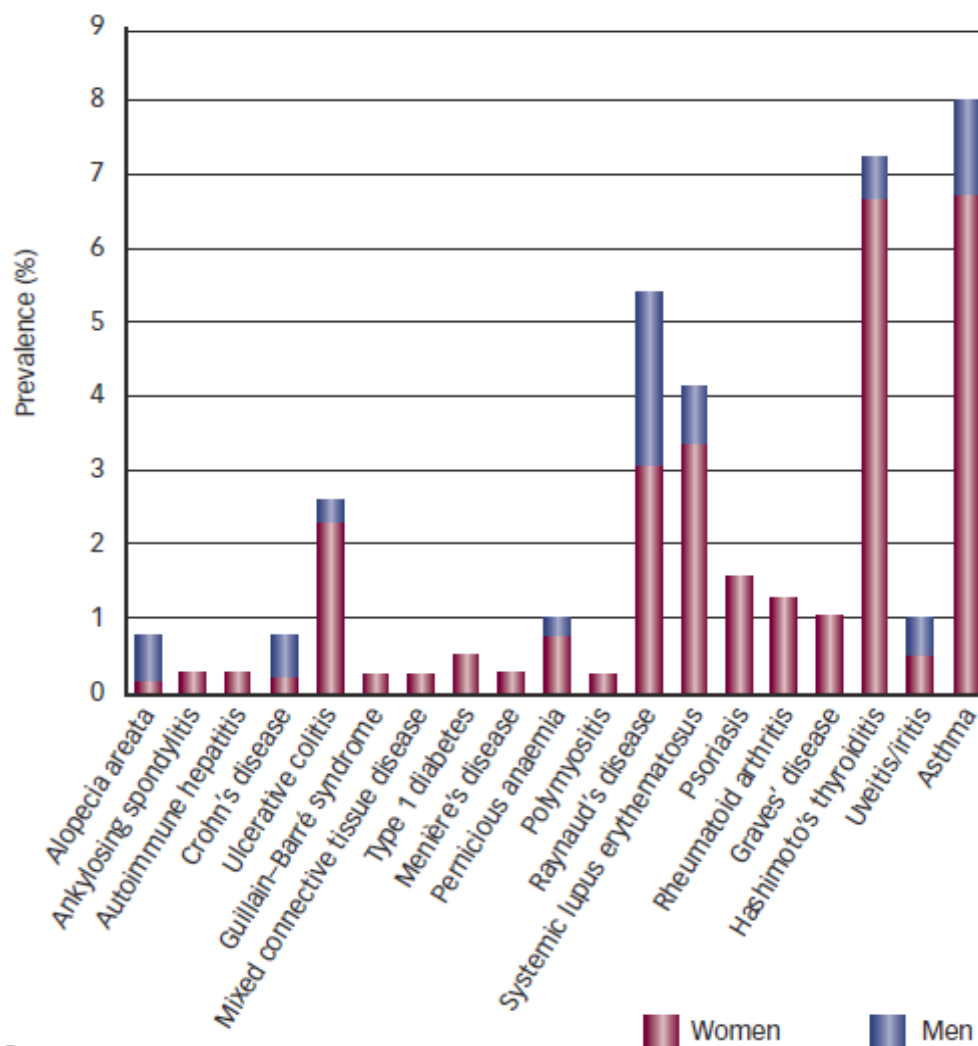
Μια άλλη πιο πειστική απόδειξη είναι επίσης το γεγονός ότι όταν με φάρμακα αποκλείσεις την είσοδο ανοσολογικών κυττάρων στο ΚΝΣ, τότε το ποσοστό υποτροπής και η εξέλιξη της ΠΣ προς την αναπηρία επηρεάζονται θεαματικά προς το καλύτερο. Τέτοια παραδείγματα είναι η χρήση ναταλιζουμάμπης που εμποδίζει την μετανάστευση των λεμφοκυττάρων στο ΚΝΣ [34] και το fingolimod που παγιδεύει τα λεμφοκύτταρα στους περιφερικούς λεμφαδένες [35].

Μέχρι πρόσφατα, τα κλινικά δεδομένα που σχετίζονται με την συνύπαρξη αυτοάνοσων νοσημάτων σε ασθενείς με ΠΣ βασίζονται σε πολύ λίγες μελέτες μικρού αριθμού περιστατικών στους οποίους μπορεί να υπάρχουν διάφοροι συγχυτικοί παράγοντες (confounding factors) όπως η ηλικία και το φύλο. Υπάρχουν δυο μόνο ολοκληρωμένες αναλύσεις της συχνότητας των αυτοάνοσων νοσημάτων στην ΠΣ στη διεθνή βιβλιογραφία, που δημοσιεύθηκαν το 2011 και το 2015 αντίστοιχα [36,37]. Σε αυτές φαίνεται ότι υπάρχουν κάποιες παθήσεις που έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης σε ασθενείς με ΠΣ. Οι πιο υψηλές συχνότητες συνεμφάνισης παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, συστηματικό ερυθρελάτη, σύνδρομο Raynaud, ελκώδη κολίτιδα και άσθμα όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 2).

Σε καμιά όμως από τις συσχετίσεις δεν ανευρέθηκε συχνότητα εμφάνισης κάποιου αυτοάνοσου νοσήματος, σε ασθενείς με ΠΣ, μεγαλύτερη του 10% [36,37]. Όταν μάλιστα συγκριθούν οι συχνότητες αυτές με αυτές που ανευρίσκονται σε υγιή πληθυσμό (ταυτόσημης ηλικίας και αναλογίας φύλου), ο συσχετισμός αυτός φαίνεται να εξαφανίζεται (πχ στην Θυρεοειδίτιδα Hashimoto όπου το Odds Ratio είναι πρακτικά περίπου 1).

Σε ότι αφορά την συχνότητα εμφάνισης αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος σε ασθενείς με ΠΣ, οι μελέτες που έχουν γίνει είναι πολύ λίγες και χωρίς εντυπωσιακά αποτελέσματα

Αυτοάνοση ηπατίτιδα. Η συχνότητα εμφάνισης της αυτοάνοσης ηπατίτιδας, σε μία μελέτη, ήταν μόλις 0,17%, ποσοστό που δε διέφερε από δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν το γενικό πληθυσμό [38]. Μία μεταγενέστερη μελέτη που γίνεται σε σύγκριση με τον επιπολασμό της ηπατίτιδας στον πληθυσμό MS πριν από τη διάγνωση με ταυτισμένη ηλικία και φύλο επίσης δεν βρήκε καμία διαφορά στη συχνότητα ΑΗ στον υγιή πληθυσμό και στους ασθενείς με ΠΣ [39]. Έτσι γενικά όλες οι μελέτες αναδεικνύουν μια μικρή μόνο συχνότητα συνύπαρξης ΑΗ και ΠΣ που κυμαίνεται από 0,06 έως 0,2% [40,41].



3

Σχήμα 2 - Συχνότητα αυτοάνοσων νοσημάτων που έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ΠΣ (Ανατύπωση από: Regina Berkovich, Dawood Subhani, and Lawrence Steinman, Autoimmune Comorbid Conditions in Multiple Sclerosis *US Neurology*, 2011;7(2):132–8)

Πρωτοπαθής χολική κίρρωση. Η συχνότητα εμφάνισης της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης, σε μια αρχική μελέτη από τη Δανία βασισμένη στον πληθυσμό, ήταν 0,01% [42]. Πέντε μεταγενέστερες μελέτες ανέφεραν την εμφάνιση της πρωτοπαθούς χολικής κίρρωσης σε ασθενείς με ΠΣ να κυμαίνεται από μηδέν έως 0,12% και πρακτικά να μην υπάρχει σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την συχνότητα που ανευρίσκεται στον γενικό πληθυσμό [39,43,44].

Πίνακας 1 - Μερικές από τις πιο συχνές συσχετίσεις αυτοάνοσων νοσημάτων με την ΠΣ και ο βαθμός συσχέτισης τους συγκρινόμενος με αντίστοιχο πληθυσμό (Ανατύπωση από: Regina Berkovich, Dawood Subhani, and Lawrence Steinman, Autoimmune Comorbid Conditions in Multiple Sclerosis *US Neurology*, 2011;7(2):132–8)

Condition	Description	Frequency in MS Prior to Diagnosis (%)	Frequency in Matched Controls	Adjusted OR (95% CI); p-value
Autoimmune hepatitis	Rare event, but should be considered when re-exposing MS patients with previous hepatic damage to immunomodulatory drugs	0.06	0.02	2.5 (0.6–9.9) p=0.20
Autoimmune thyroiditis	Inflammation of the thyroid and decrease in thyroxin secreted. Significantly more prevalent in male MS patients than in male controls (9.4 versus 1.9 %; p=0.03). Studies are needed to show whether autoimmune thyroiditis influences disease progression	0.17	0.18	1.0 (0.5–1.9)
Guillain–Barré syndrome	Acute inflammatory demyelinating polyneuropathy of the peripheral nervous system, causing weakness and more serious damage to the autonomic system	0.1	0.02	5.0 (1.6–15.4) p=0.006
Inflammatory bowel disease	Genetic evidence suggests that inflammatory bowel disease and systemic lupus erythematosus are linked. One case has been reported of an MS patient who developed ulcerative colitis following treatment with IFNβ-1a. An Australian registry study found an association between ulcerative colitis and MS	0.8	0.45	1.7 (1.2–2.5) p=0.002
Scleroderma	Cases of scleroderma developing following MS have been reported	0.06	0.06	1.0 (0.3–3.4)
Type 1 diabetes	A Sardinian cohort study found a fivefold higher prevalence of diabetes in MS patients than in the general population	0.85	0.9	0.9 (0.7–1.3)
Uveitis	Well-documented association between uveitis and MS. Occurrence varies widely, between 0.4 and 26.9 %. IFNβ-1a has been found to be beneficial in the treatment of MS-associated uveitis	1.3	0.6	2.2 (1.7–2.9) p<0.001
Psoriasis	A recent systematic review of the literature concluded that psoriasis does not appear to be more common in patients with MS or their relatives	1.3	1.2	1.1 (0.8–1.4)
Rheumatoid arthritis	MS and rheumatoid arthritis appear to have a reduced chance of coexistence	0.83	0.86	1.0 (0.7–1.3)
Asthma (without chronic obstructive pulmonary disease)	A large North American study found no association between MS and asthma. However, a retrospective study in Wales established an inverse relationship between asthma and MS	2.8	3.0	0.9 (0.8–1.1)
Systemic lupus erythematosus	A recent American population-based case-control study found no increased likelihood of MS patients having or developing systemic lupus erythematosus	0.4	0.3	1.3 (0.8–2.2)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 - ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΕ ΑΥΤΟΑΝΟΣΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ ΗΠΑΤΟΣ.

4.1. ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΗΠΑΤΙΤΙΔΑ (ΑΗ)

Η ΑΗ είναι μια χρόνια νεκροφλεγμονώδης ηπατική νόσος άγνωστης αιτιολογίας που οδηγεί σε προοδευτική καταστροφή του ήπατος, με αποτέλεσμα τη συχνή μετάπτωση σε κίρρωση και την αυξημένη θνητότητα, ιδιαίτερα αν η νόσος δε διαγνωστεί έγκαιρα και αφεθεί χωρίς ανοσοκατασταλτική θεραπεία.

Η νόσος προσβάλλει κυρίως γυναίκες, με αναλογία γυναικών/ανδρών 4:1. Ενώ μέχρι πρόσφατα υπήρχε η άποψη ότι η νόσος προσβάλλει συχνότερα κορίτσια 5-20 ετών, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι κατά την έναρξη της νόσου, οι περισσότεροι ασθενείς είναι ηλικίας 50-70 ετών, διαπίστωση που αναγνωρίζεται και από τα τροποποιημένα κριτήρια για τη διάγνωση της ΑΗ [45,46].

4.1.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΑΗ

Η ΑΗ μπορεί να εκδηλωθεί ως εξής [45]:

Α) Ήπια συμπτωματική μορφή. Αποτελεί την πιο συχνή μορφή (περίπου 60%) και συνήθως τα άτομα αυτά μπορεί να αναπτύξουν κίρρωση χωρίς να έχουν ιδιαίτερα ενοχλήματα. Υπάρχουν διάφορα γενικά μη ειδικά συμπτώματα, όπως κακουχία, ανορεξία, απώλεια βάρους, αίσθημα αδυναμίας και εύκολης κόπωσης, διάχυτες αρθραλγίες και μυαλγίες. Αντικειμενικά μπορεί να διαπιστωθεί υπερτρίχωση, σταγονοειδής ακμή, πολλαπλές τηλεαγγειεκτασίες και ηπατοσπληνομεγαλία. Αμηνόρροια και ίκτερος μπορεί επίσης να συνυπάρχουν.

Β) Οξεία μορφή. Απαντάται στο 20-30% των ασθενών, με κλινική εικόνα παρόμοια με αυτή της οξείας ιογενούς ηπατίτιδας. Σπάνια, η οξεία μορφή μπορεί να είναι ανικτερική ενώ σπανιότερα μπορεί να εκδηλωθεί με τη μορφή οξείας κεραυνοβόλου ηπατικής ανεπάρκειας (2-10% του συνόλου των περιπτώσεων ΑΗ), συνήθως σε παιδιά μικρότερα των 10 ετών.

Γ). Ασυμπτωματική μορφή. Απαντάται στο 10-20 % των ασθενών με ΑΗ. Η νόσος διαδράμει εντελώς ασυμπτωματικά, οπότε και η διάγνωση γίνεται τυχαία (στα πλαίσια κλινικής εξέτασης με διαπίστωση ηπατοσπληνομεγαλίας και βιοχημικών εξετάσεων ρουτίνας οπότε μπορεί να διαπιστωθεί τρανσαμινασαιμία) και συνήθως σε προχωρημένα στάδια.

4.1.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΑΗ

Εκτός των επηρεασμένων ηπατικών βιοχημικών δεικτών (κυρίως αύξηση της χολερυθρίνης και των αμινοτρανσφερασών), χαρακτηριστική είναι και η παρουσία διάχυτης

υπεργαμμασφαιριναιμίας (κυρίως IgG, ενώ η IgA μπορεί να είναι μειωμένη) καθώς και διαφόρων οργανοειδικών και μη αυτοαντισωμάτων, που αποτελούν ιδιαίτερα σημαντικούς εργαστηριακούς δείκτες για τη διάγνωση, τη διαφορική διάγνωση και ταξινόμηση της ΑΗ.

4.1.3 ΑΥΤΟΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΑΗ

Σύμφωνα με τα αυτοαντισώματα, που ανιχνεύονται, η ΑΗ υποδιαιρέθηκε αρχικά σε τρεις τύπους:

α) την ΑΗ τύπου 1 (ΑΗ-1), που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA ή/και SMA και ήταν παλαιότερα γνωστή ως κλασσική ή λυκοειδής ηπατίτιδα. Επιπλέον, ανιχνεύονται p-ANCA και αντισώματα έναντι του υποδοχέα της ασιαλογλυκοπρωτεΐνης (αντι-ASGP-R).

β) Την ΑΗ τύπου 2 (ΑΗ-2), που χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών αυτοαντισωμάτων έναντι μικροσωμιακών αντιγόνων ήπατος-νεφρών τύπου 1 (liver-kidney microsomal antibodies, αντι-LKM 1) ή/και αυτοαντισωμάτων κατά κυτοσολίων ήπατος τύπου 1 (antibodies against liver cytosol type 1, αντι-LC 1).

γ) Την ΑΗ τύπου 3 (ΑΗ-3), που χαρακτηρίζεται από την ανίχνευση αντισωμάτων κατά διαλυτών αντιγόνων ήπατος (soluble liver antigens, αντι-SLA), τα οποία,, βρέθηκε ότι είναι ίδια με τα αυτοαντισώματα κατά αντιγόνου ήπατος-παγκρέατος (liver-pangreas antigen, αντι-LP). Για τον παραπάνω λόγο σήμερα πλέον μιλάμε για αντι-SLA/LP αυτοαντισώματα [45-48].

Παρακάτω θα αναφερθούν τα σημαντικότερα από τα αυτοαντισώματα αυτά, τα οποία και προσδιορίσαμε στο ειδικό μέρος της μελέτης μας.

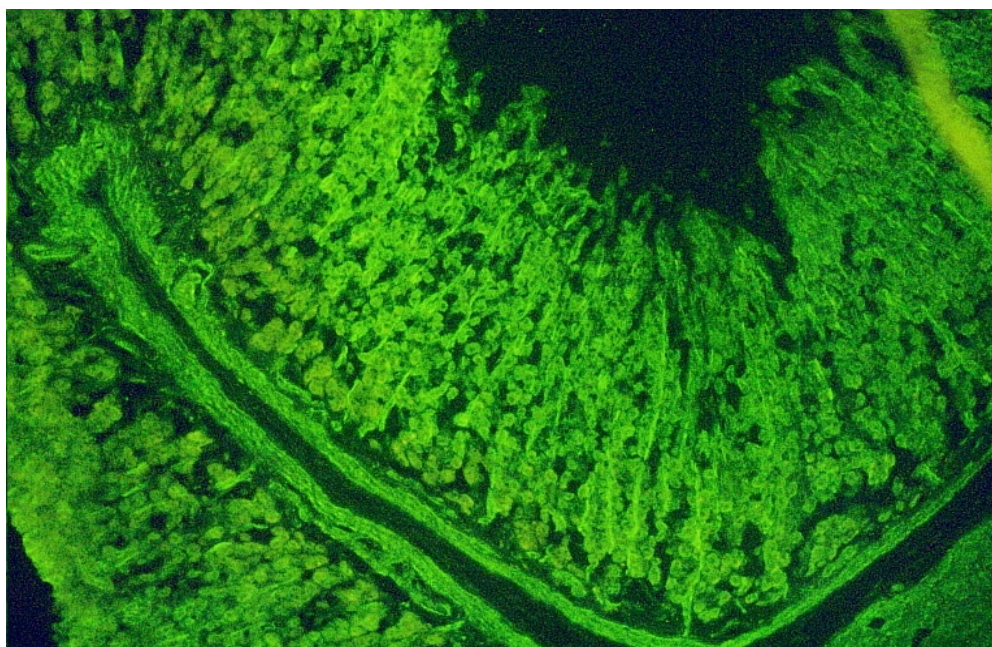
α. Αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA)

Η ΑΗ-1 χαρακτηρίζεται από την παρουσία ANA σε σημαντικούς τίτλους (θετικός τίτλος $\geq 1:80$ σε ενήλικες και $\geq 1:40$ σε παιδιά). Τα ANA ανιχνεύονται με ΕΑΦ χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα HEp2 κύτταρα. Έχουν παρατηρηθεί διάφοροι τύποι ανοσοφθορισμού σε υπόστρωμα HEp2 κυττάρων, με ποιο συχνούς τον ομοιογενή ή διάχυτο (homogenous) (συχνότητα 34-58%) και τον λεπτό στικτό (fine speckled) (συχνότητα 21-34%). Τα αυτοαντιγόνα στόχοι των ANA που ανιχνεύονται στην ΑΗ-1, ποικίλλουν (έναντι μονής ή διπλής έλικας DNA, ιστόνες, κυκλίνη Α, t-RNA, sn-RNPs, λαμινίνη Α και C, κεντρομεριδίο κ.λ.π.), αλλά δε φαίνεται να έχουν ιδιαίτερη διαγνωστική ή άλλη αξία, ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση διαφορετικών κλινικών υποομάδων της ΑΗ-1 [45-48].

β. Αντισώματα έναντι λείων μυϊκών ινών (SMA)

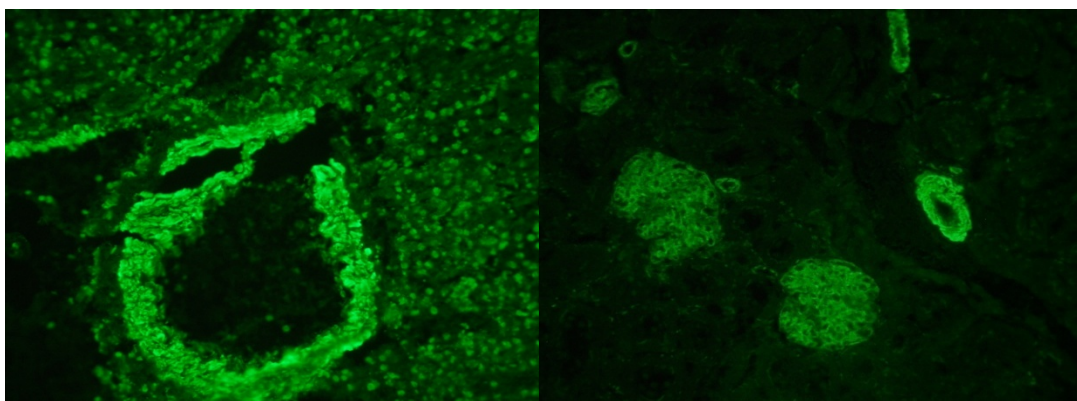
Τα SMA ανιχνεύονται με την τεχνική του ΕΑΦ, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα HEp2 κύτταρα, ή επί το ιδανικότερο τομές ήπατος-νεφρών-στομάχου σε κρυοστάτη (θετικός τίτλος

$\geq 1:40$). Το βασικότερο αυτοαντιγόνο στόχος είναι η πολυμερισμένη (filamentous) F-ακτίνη του κυτταροσκελετού, αλλά εμφανίζεται αντιδραστικότητα και έναντι άλλων συστατικών του κυτταροσκελετού (τουμπουλίνη, βιμεντίνη, δεσμίνη, σκελετίνη). Σε γενικές γραμμές δε φαίνεται ότι οι αντιδραστικότητες αυτές να έχουν προγνωστική ή διαγνωστική αξία. Εντούτοις η παρουσία SMA κατά F-ακτίνης χαρακτηρίζει συνήθως την πορεία και την έκβαση των προσβληθέντων ασθενών [45,48,49]. Επίσης, φαίνεται ότι η ανοσοκατασταλτική αγωγή οδηγεί σε μείωση των τίτλων των SMA και έμμεσα αποτελεί δείκτη ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Η παρακολούθηση των τίτλων των αυτοαντισωμάτων δε συνιστάται, γιατί δεν αποτελεί εξαιρετικά αξιόπιστο προγνωστικό βιοδείκτη.



Εικόνα 6 - Φθορισμός SMA έναντι νηματίων F-ακτίνης σε υπόστρωμα τομής στομάχου αρουραίου που χαρακτηρίζει τους ασθενείς με ΑΗ.

Τα SMA αντισώματα ανιχνεύονται με έμμεσο ανοσοφθορισμό σε τομές νεφρού, στομάχου και ήπατος. Σε τομές νεφρού μπορεί η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι ακτίνης (SMA) να γίνει στις μυικές ίνες γύρω από τα αγγεία οπότε και μιλάμε για νεφρική μορφή (Vessel, V-SMA), ή στα σπειράματα του νεφρού (Glomerular, G-SMA) ή και στα σωληνάκια (Tubular, T-SMA μορφή). Αντίθετα όπως είπαμε ανιχνεύονται και στο στομάχι με τη μορφή ινιδίων (F-SMA μορφή). Η F-SMA μορφή είναι απόλυτα ειδική για την αυτοάνοση ηπατίτιδα. Τα μοτίβα VG και VGT είναι πιο συγκεκριμένα για ΑΙΗ από το μοτίβο V. Αντίθετα το μοτίβο V δεν αποτελεί αποκλειστικό χαρακτηριστικό μόνο της ΑΗ καθώς ανιχνεύεται και σε άλλες αυτοάνοσες και λοιμώδεις παθήσεις [46,49,50].



Εικόνα 7 - Αντισώματα SMA έναντι τοιχώματος αγγείων (V-SMA, μη ειδικά για AH) και σπειράματος (G-SMA).

γ. Αντι-SLA/LP αντισώματα

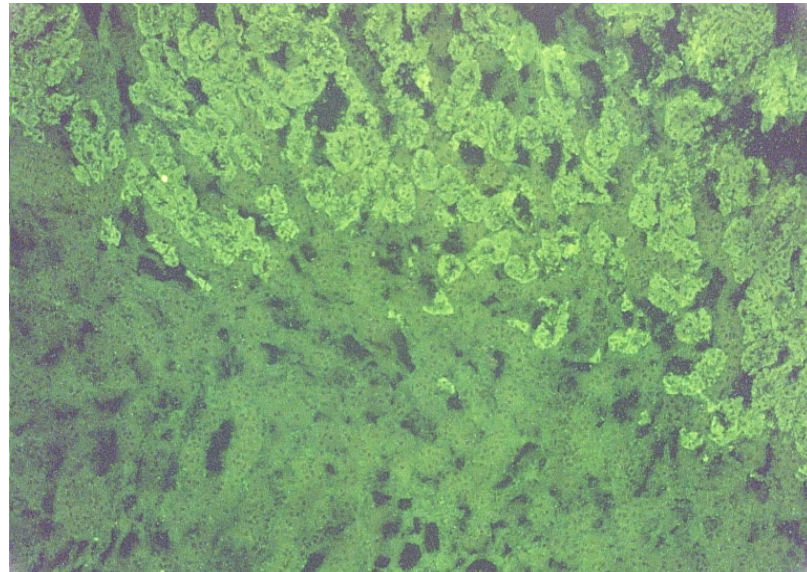
Τα αντι-SLA/LP ανιχνεύονται με μεθόδους ELISA, με ραδιοανοσοενζυμικές μεθόδους, με μεθόδους ανοσοαποτύπωσης και ανοσοκαθίζηση με ραδιοδεσμευτικές μεθόδους. Είναι αυτοαντισώματα ειδικά για την AH-1, ανευρίσκονται στο 10-30% των ατόμων, δεν ανιχνεύονται σχεδόν ποτέ σε οξείες ή χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες και αποτελούν δείκτη σοβαρότερης μορφής της νόσου. Το αυτοαντιγόνο στόχος είναι μια πρωτεΐνη του κυτοσολίου μοριακού βάρους 50 kDa. Τελευταία το αυτοαντιγόνο στόχος έχει κλωνοποιηθεί και φαίνεται να είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που σχετίζεται με το σύμπλεγμα της t RNP (Ser)Sec και ανήκει στην οικογένεια των υδρόξυ-μέθυλο-τρανσφερασών σερίνης SEP-SECS [45-48].

δ. Αντι-LKM αντισώματα

Τα αντισώματα αυτά περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1973 και ανιχνεύονται με την τεχνική του ΕΑΦ χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ήπαρ και νεφρό αρουραίου ή ποντικού, δίνοντας ένα διάχυτο σήμα στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων, και αποκλειστική αντιδραστικότητα μόνο του P3 τμήματος των εγγύς νεφρικών σωληναρίων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικής διαχωριστικής γραμμής (borderline). Τα αντισώματα αυτά ανιχνεύονται κυρίως στην AH-2, ενώ σπανιότερα ανευρίσκονται στην χρόνια ηπατίτιδα C, και ακόμη σπανιότερα στην χρόνια ηπατίτιδα D και σε ορισμένες περιπτώσεις φαρμακευτικών ηπατιτίδων [45-48].

Τα αντι-LKM διακρίνονται σε τρεις επιμέρους τύπους. Τα αντι-LKM-1, ανιχνεύονται στην πλειονότητα των περιπτώσεων της AH-2 (90-95 %) καθώς και στο 2-10% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα, και έχουν ως αυτοαντιγόνο-στόχο το κυτόχρωμα P450 2D6. Τα αντι-LKM-2 ανιχνεύονται σε ορισμένες περιπτώσεις φαρμακευτικών ηπατιτίδων (ιδιαίτερα από πιενλικό οξύ),

με αυτοαντιγόνο στόχο το KYTP4502C9. Τέλος τα αντι-LKM-3, έχουν ως αυτοαντιγόνο-στόχο την οικογένεια 1 των UDP-γλυκουρονικών τρανσφερασών (UGT-1), ανιχνεύονται στο υπόλοιπο 5-10 % των ασθενών με AH-2 και στο 10-13% των ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα D [45-47].



Εικόνα 8 - Αντι-LKM αντισώματα. Υπάρχει φθορισμός μόνο των εγγύς εσπειραμένων σωληναρίων σε τομή νεφρού αρουαίου με αποτέλεσμα την δημιουργία χαρακτηριστικής διαχωριστικής γραμμής (borderline).

ε. Αντι-LC1 αντισώματα

Τα αντι -LC1, ανιχνεύονται με ΕΑΦ, με διπλή ανοσοδιάχυση, με ανάστροφη ανοσοηλεκτροφόρηση και με ανοσοαποτύπωση. Μετά την ταυτοποίηση του αυτοαντιγόνου-στόχου των αντι-LC1 (ένζυμο φορμιμίνιο-τρανσφεράση-κυκλοδεαμινάση που εμπλέκεται στον μεταβολισμό του φυλικού οξέος), έχουν αναπτυχθεί και μέθοδοι ELISA. Με την τεχνική του ΕΑΦ μπορεί να παρατηρηθεί φθορισμός των ηπατοκυττάρων που διακόπτεται γύρω από την κεντρική φλέβα, αλλά λόγω συνύπαρξης τους με την παρουσία των αντι-LKM-1 αντισωμάτων στο 50% των ασθενών, το πρότυπο αυτό δεν είναι εμφανές. Εκτός από την AH-2, τα αντι-LC1 μπορούν να παρατηρηθούν και σε ασθενείς με ηπατίτιδα C με ανιχνεύσιμα αντι-LKM-1 αντισώματα. Η ύπαρξη των αντι-LC1 στους ασθενείς με AH-2, φαίνεται να συσχετίζεται με την ενεργότητα και τη βαρύτητα της νόσου υποδεικνύοντας τον πιθανό παθογενετικό ρόλο αυτών των αντισωμάτων [45-48].

4.2. ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΧΟΛΙΚΗ ΚΙΡΡΩΣΗ (ΠΧΚ)

Η ΠΧΚ είναι μια αυτοάνοση χρόνια χολοστατική νόσος του ήπατος που χαρακτηρίζεται από φλεγμονώδη διήθηση και καταστροφή των μικρών ενδοηπατικών χοληφόρων πόρων οδηγώντας προοδευτικά σε κίρρωση και σε έκπτωση της ηπατικής λειτουργίας. Η νόσος προσβάλλει κατά κύριο λόγο γυναίκες (με αναλογία ως προς τους άνδρες 6:1 έως 22:1) μέσης

ηλικίας μεταξύ 40 και 60 ετών. Η συχνότητα της νόσου ποικίλει στις διάφορες μελέτες και κυμαίνεται μεταξύ 30 ανά 100.000 κατοίκους σε πληθυσμούς με μεγάλη συχνότητα όπως η Νότια Αγγλία, μέχρι και σε λιγότερο από 25 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο σε περιοχές όπως ο Καναδάς και η Αυστραλία ή και πρακτικά μηδενική συχνότητα σε περιοχές όπως η Ινδία και η Κεντρική Αφρική [45,46,51].

4.2.1. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ ΠΧΚ

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου ποικίλλουν από την εντελώς ασυμπτωματική ανικτερική μορφή με ή χωρίς εξωηπατικές εκδηλώσεις μέχρι και την σοβαρής μορφής χολόσταση με εμφάνιση βασανιστικού κνησμού, κίρρωσης και έκπτωσης της ηπατικής λειτουργίας. Για μεγάλο χρονικό διάστημα η νόσος είναι ασυμπτωματική, ενώ ένας γενικευμένος άλλοτε άλλου βαθμού κνησμός συνήθως αποτελεί το πρώτο σύμπτωμα σε συνδυασμό με ένα αίσθημα κόπωσης που πολλές φορές μπορεί να είναι σημαντικού βαθμού. Στη φυσική εξέταση μπορούν ακόμη να διαπιστωθούν ξανθώματα και ξανθελάσματα, ηπατομεγαλία καθώς και σημεία πυλαίας υπέρτασης σε προχωρημένα στάδια [45].

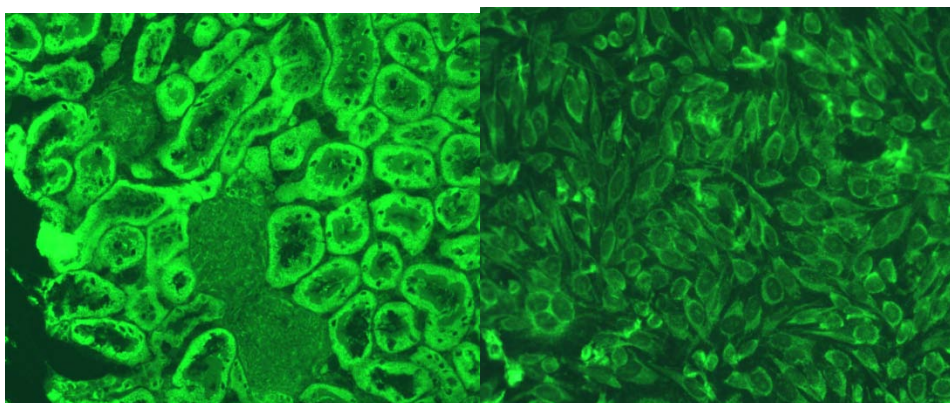
4.2.2. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ ΠΧΚ

Στην ΠΧΚ, συχνά ανευρίσκεται αύξηση ενός ή περισσότερων χολοστατικών ενζύμων όπως: της αλκαλικής φωσφατάσης, της γ-γλουταμυλικής τρανσφεράσης και της 5-νουκλεοτιδάσης. Εντούτοις, στα αρχικά προ-συμπτωματικά στάδια, οι δοκιμασίες αυτές είναι συνήθως φυσιολογικές. Οι αμινοτρασφεράσες είναι συνήθως ελαφρά αυξημένες και σπάνια ξεπερνούν το 5-πλάσιο των ανωτέρων φυσιολογικών τιμών. Η ολική χολερυθρίνη είναι συνήθως εντός των φυσιολογικών ορίων στα αρχικά στάδια και αυξάνει με την εξέλιξη της νόσου. Συχνά συνυπάρχει υπερχοληστερολαιμία και μειωμένη τιμή λιποπρωτεΐνης α. Υπάρχει επίσης υπεργαμμασφαιριναιμία, κυρίως των IgM τάξης ανοσοσφαιρινών και κατά δεύτερο λόγο των IgG, ενώ μπορεί να έχουμε και ενεργοποίηση του συμπληρώματος αν και τα επίπεδα του C3 είναι συνήθως φυσιολογικά [45].

4.2.3. ΑΝΤΙΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (AMA)

Το πιο τυπικό εργαστηριακό εύρημα των ασθενών με ΠΧΚ είναι η παρουσία αντιμιτοχονδριακών αυτοαντισωμάτων (anti-mitochondrial antibodies, AMA) που θεωρούνται ειδικά για τη νόσο και αποτελούν ακρογωνιαίο λίθο για τη διάγνωση της ΠΧΚ. Τα AMA δίνουν

ένα χαρακτηριστικό πρότυπο ανοσοφθορισμού σε υπόστρωμα ήπατος-νεφρού-στομάχου τρωκτικών ή σε υπόστρωμα HEp2 κυττάρων.



Εικόνα 9 - Φθορισμός των AMA σε τομές νεφρού αρουραίου (αριστερά). Τα AMA δίνουν φθορισμό στα εγγύς και άπω σωληνάρια αλλά όχι στα σπειράματα. Φθορισμός των AMA σε υπόστρωμα HEp2 κυττάρων (δεξιά).

Η ταυτοποίηση των αντιγονικών στόχων των AMA αποτέλεσε ένα σημαντικό βήμα για τη μελέτη των ασθενών με ΠΧΚ. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα μιτοχονδριακά αντιγόνα αποτελούν μέρος του πολυενζυμικού συμπλέγματος της 2-κετοξικήςδεϋδρογονάσης το οποίο αποτελείται από επιμέρους συμπλέγματα: το σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής δεϋδρογονάσης (ΠΔΓ) (pyruvate dehydrogenase complex-PDC), το σύμπλεγμα της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης με διακλαδισμένη άλυσσο (ΚΔΓΔΑ) (branched-chain 2-oxoacid pyruvate dehydrogenase complex-BCOADC) και το σύμπλεγμα της κετογλουταρικής δεϋδρογονάσης (ΚΓΔΓ) (2-oxoglutarate pyruvate dehydrogenase complex-OGDC). Κάθε ένα από τα ενζυμικά αυτά συμπλέγματα παίζει σημαντικό ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό του κυττάρου: το ΠΔΓ συνδέει την πορεία της γλυκόλυσης με τον κύκλο του Krebs, το ΚΓΔΓ είναι βασικό ένζυμο του κύκλου του Krebs και το ΚΔΓΔΑ συμμετέχει στον μεταβολισμό και την οξείδωση των αμινοξέων με διακλαδισμένη άλυσσο [45,52-54].

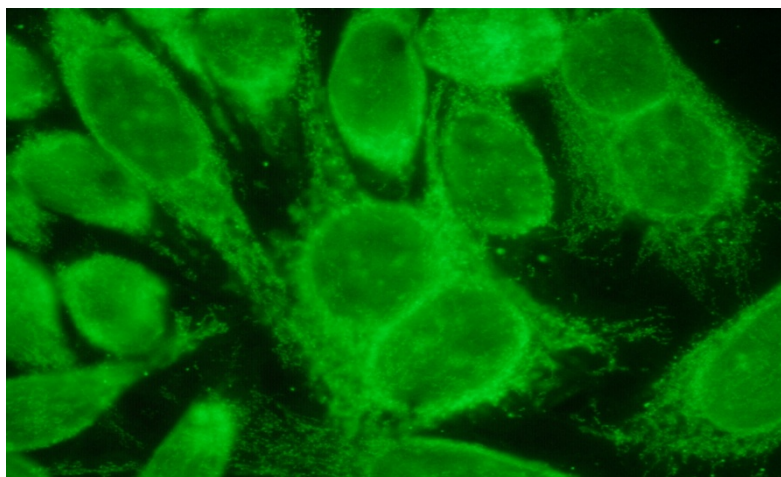
Πίνακας 2 - Μιτοχονδριακά αυτοαντιγόνα των ΑΜΑ. ΠΔΓ = πυροσταφυλική δεϋδρογονάση, ΚΔΓΔΑ = 2-κετοξική δεϋδρογονάση με διακλαδισμένη άλυσσο, ΚΓΔΓ = κετογλουταρική δεϋδρογονάση, ΑΜΑ=αντιμιτοχονδριακά αντισώματα

Υποομάδες του συμπλέγματος της 2-κετοξικής δεϋδρογονάσης				
<i>Μοριακή ταυτοποίηση</i>	<i>Προηγούμενη ονομασία</i>	<i>Μοριακό βάρος (kDa)</i>	<i>Λειτουργία</i>	<i>Συχνότητα (%)</i>
1) ΠΔΓ				
E1-α-αποκαρβοξυλίωση	M2d	41	Αποκαρβοξυλίωση πυροσταφυλικού με πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) σαν συμπαράγοντα	41-66
E1-β-αποκαρβοξυλίωση	M2e	36	Αποκαρβοξυλίωση πυροσταφυλικού με πυροφωσφορική θειαμίνη (TPP) σαν συμπαράγοντα	2-7
E2 ακετυλοτρανσφεράση	M2a	74	Μεταφορά ακετυλο-ομάδων από E1 στο CoA	92-95
Πρωτεΐνη X (E3BP)	M2c	52	Άγνωστη	95
2) ΚΔΓΔΑ				
E2 ακυλοτρανσφεράση	M2c	50	Μεταφορά ακυλο-ομάδων από E1 στο CoA	53-55
3) ΚΓΔΓ				
E2 ηλεκτρική τρανσφεράση	M2c	48	Μεταφορά ηλεκτρώλο-ομάδων από E1 στο CoA	39-88

4.2.4. ΑΝΤΙΠΥΡΗΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (ΑΝΑ) ΣΤΗΝ ΠΧΚ

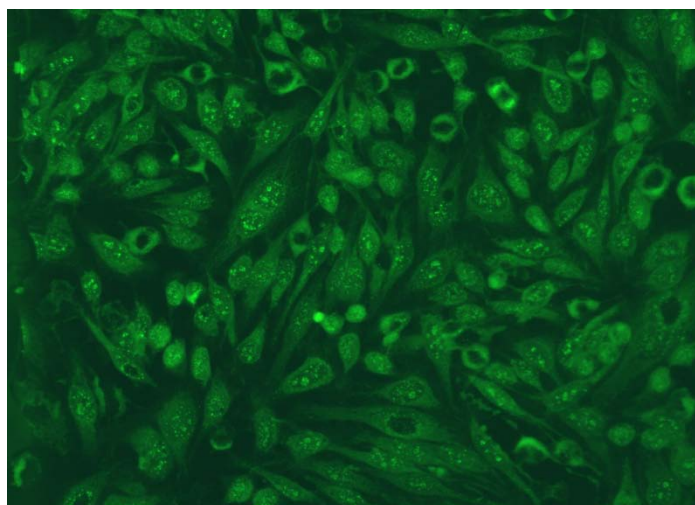
Εκτός από την ανεύρεση ΑΝΑ που δεν είναι απόλυτα ειδικά για τη νόσο, όπως anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, Scl-70, αντι-κεντρομεριδιακά, αντι-ιστονικά κ.α., η ΠΧΚ χαρακτηρίζεται από την παρουσία ειδικών για την νόσο ΑΝΑ [45,52,53,55]. Αυτά είναι:

Αντι-gr210 αντισώματα. Έχουν ειδικότητα έναντι μιας διαμεμβρανικής πρωτεΐνης 210 kDa (gr210). Είναι πολυκλωνικά αντισώματα αλλά υπάρχουν δυο κύριοι αντιγονικοί επίτοποι: ένας αμινοτελικός 15 αμινοξέων, και ένας καρβοξυτελικός στο κυτταροπλασματικό τμήμα του μορίου. Τα αντισώματα αυτά είναι ειδικά για την ΠΧΚ, είναι υπεύθυνα για το χαρακτηριστικό RLM (rim-like/ membranous) πρότυπο φθορισμού που δίνουν σε υπόστρωμα HEp2 κυττάρων.



Εικόνα 10 - Πρότυπο φθορισμού RLM, σε ασθενή με ΠΧΚ χαρακτηριστικό της ανίχνευσης αντισωμάτων έναντι πυρηνικής μεμβράνης τα σημαντικότερα από τα οποία είναι τα αντισώματα έναντι gp210.

Αντι-sp100 αντισώματα. Έχουν ως αντιγόνο-στόχο μια πυρηνική πρωτεΐνη 100 kDa και δίνουν το χαρακτηριστικό πρότυπο MND (multiple nuclear dots-πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων) σε υπόστρωμα HEp2 κυττάρων (Εικόνα 11). Ανιχνεύονται περίπου στο 20-30% των ασθενών με ΠΧΚ, και θεωρούνται ειδικά αντισώματα για τη διάγνωση της νόσου [56].



Εικόνα 11 - Πρότυπο φθορισμού πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων (MND) σε υπόστρωμα HEp2 κυττάρων με βασικό αντιγονικό στόχο την πρωτεΐνη sp100.

PML αντισώματα. Η πρωτεΐνη PML, είναι μια υβριδική πρωτεΐνη που αποτελεί προϊόν σύντηξης με τον υποδοχέα του ρετινοϊκού οξέος. Πρωτοπατηρήθηκε σε ασθενείς με οξεία προμυελοκυτταρική λευχαιμία το 1990 [57]. Σε μια μεταγενέστερη όμως έρευνα, διαπιστώθηκε ότι αντισώματα έναντι της PML εκφράζονται σε σημαντικό ποσοστό και σε ασθενείς με ΠΧΚ, και πολύ συχνά συνυπάρχουν με τα αντισώματα έναντι sp100 δίνοντας και το ίδιο πρότυπο ανοσοφθορισμού (μορφή πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων) [56,58].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΑΣΘΕΝΕΙΣ

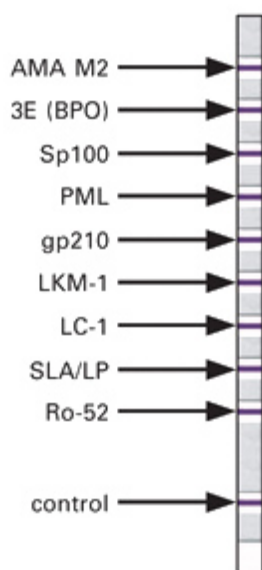
Στην μελέτη συμπεριλήφθησαν συνολικά 133 ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας. Από αυτούς οι 40 ήταν άνδρες και οι υπόλοιποι 93 γυναίκες. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 42.7 ± 11.9 έτη ενώ η μέση ηλικία κατά την διάγνωση της νόσου ήταν τα 31.5 ± 10.4 έτη. Σε ότι αφορά την μορφή της νόσου, οι 102 από αυτούς (76.6%) ήταν RRMS, οι 27 είχαν SPMS μορφή και οι υπόλοιποι 5 είχαν την πιο σπάνια PPMS μορφή της νόσου. Η μέση διάρκεια της νόσου ήταν 11.2 ± 7.2 έτη, ο αριθμός των υποτροπών ήταν 5 ± 3.6 κατά μέσο όρο, ενώ το EDSS σκορ βαρύτητας της νόσου ήταν 3.3 ± 2.1 . Τα συνολικά δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη φαίνονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3).

Πίνακας 3 - Συγκεντρωτικά δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με MS που συμπεριλήφθησαν στην μελέτη.

χαρακτηριστικό	σύνολο (n=133)
φύλο (M/F)	40(30.1%) / 93(69.9%)
ηλικία	42.7 ± 11.9
Ηλικία κατά την διάγνωση	31.5 ± 10.4
(>20/<20 έτη)	132(99.2%) / 1(0.8%)
(>30/<30 έτη)	110(82.7%) / 23(17.3%)
(>40/<40 έτη)	72(51.4%) / 61(45.9%)
(>50/<50 έτη)	37(27.8%) / 96(72.2%)
(>60/<60 έτη)	14 (10.5%) / 119 (89.5%)
(>70/<70 έτη)	1 (0.8%) / 132(99.2%)
MS τύπος (RRMS / SPMS / PPMS)	102(76.6%) / 27(20.3%) / 4 (3%)
Διάρκεια νόσου	11.2 ± 7.2
EDSS	3.3 ± 2.1
Number of Relapses	5 ± 3.6
Progression Index	0.42 ± 0.56

ΜΕΘΟΔΟΙ

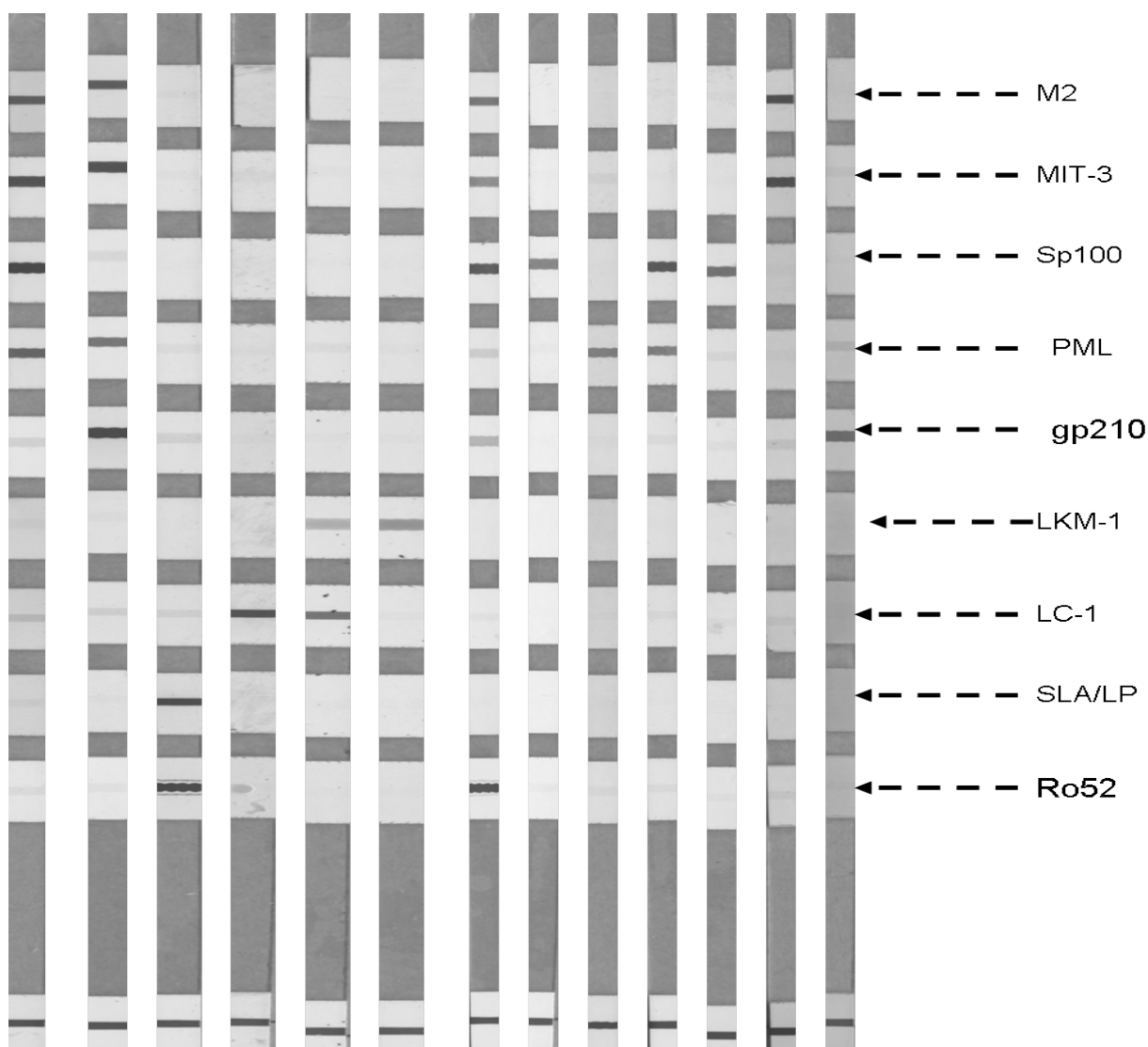
Αποτύπωση γραμμής. Η ανοσοαποτύπωση γραμμής (lineblot) έγινε με εμπορικά διαθέσιμα kits (Euroline, Euroimmun). Η τεχνική αυτή στηρίζεται στην κατασκευή λωρίδας μεμβράνης πάνω στην οποία υπάρχουν μικρές περιοχές από φύλλο κυτταρίνης. Πάνω στο φύλλο έχει επωασθεί και ενσωματωθεί ένα συγκεκριμένο καθαρισμένο και βιοχημικά χαρακτηρισμένο αντιγόνο που χρησιμοποιείται ως στερεά φάση. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει εκτίμηση (ημιποσοτική) με ένα μόνο πείραμα της παρουσίας πολλών διαφορετικών αυτοαντισωμάτων που χαρακτηρίζουν ένα νόσημα (με τη μορφή προφίλ). Ανάλογα με το φάσμα των αντιγόνων που χρησιμοποιούνται, είναι δυνατόν να αναλυθούν διάφορα αντισώματα δίπλα στο άλλο και ταυτόχρονα υπό τις ίδιες συνθήκες. Στην συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήσαμε μεμβράνη (strip) στην οποία είχαν τοποθετηθεί φύλλα κυτταρίνης επωασμένα με 9 διαφορετικά αντιγόνα που χαρακτηρίζουν αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος (Ro52, SLA/LP, LKM-1, LC-1, gp210, PML, sp100, M2 και 3E (BPO)- μια υβριδική μορφή που προκύπτει από την συγχώνευση [54] των E2 υπομονάδων των 3 κυριότερων αντιμιτοχονδριακών αντισωμάτων.



Εικόνα 12 - Σχεδιάγραμμα του strip με την διάταξη των αντιγόνων που χρησιμοποιήσαμε για τον προσδιορισμό των αυτοαντισωμάτων που σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος.

Η πορεία της πειραματικής διαδικασίας έχει συνοπτικά ως εξής. Το κάθε strip επωάζεται για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με τον ορό ασθενούς αραιωμένο 1:100 σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (sample buffer). ακολουθεί πλύσιμο των strip 3 φορές με ειδικό διάλυμα πλύσεως και στο δεύτερο στάδιο γίνεται επώαση, επίσης για μισή ώρα με αντι-ανθρώπινα αντίσωμα συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση. Ακολουθεί εκ νέου πλύσιμο όπως προηγουμένως και σε ένα τρίτο στάδιο, τα δεσμευμένα αντισώματα χρωματίζονται με ένα διάλυμα χρωμογόνου / υποστρώματος το οποίο είναι ικανό να προάγει μία αντίδραση χρώματος. Μία σκοτεινή ζώνη

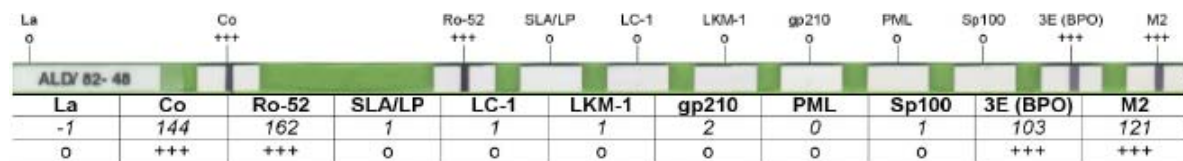
στη γραμμή του αντίστοιχου αντιγόνου εμφανίζεται αν το δείγμα του ορού περιέχει τα ειδικά αντισώματα.



Εικόνα 13 - Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελεσμάτων ασθενών με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος. Σε κάθε μεμβράνη (strip) μπορεί να υπάρχει διαφορετικό μοτίβο ανίχνευσης αντισωμάτων, με διαφορετικό βαθμό έντασης ζώνης.

Ένα ειδικό πρόγραμμα EUROLinScan της Euroimmun έχει αναπτυχθεί για να επιτρέψει την ποσοτική αξιολόγηση των ταινιών EUROLINE, έτσι ώστε να διευκολυνθεί η διαχείριση των δεδομένων, και για να παρέχει λεπτομερή τεκμηρίωση των αποτελεσμάτων. Οι μεμβράνες μετά το τέλος του πειράματος σαρώνονται με ειδικό σαρωτή EUROLinScan ο οποίος έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει τη ακριβή θέση των ταινιών, ακόμη και αν έχουν τοποθετηθεί στραβά και όχι επακριβώς γραμμικά, προσδιορίζει τις ζώνες, και μετρά την ένταση τους. Τα αποτελέσματα στη συνέχεια αποθηκεύονται μαζί με τα δεδομένα της εικόνας. Με τον τρόπο αυτό

η ημιποσοτική μέθοδος μπορεί να μετατραπεί σε ποσοτική δίνοντας αποτέλεσμα ποσοτικής μέτρησης αντιδραστικότητας για το κάθε αυτοαντίσωμα.



Εικόνα 14 - Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελέσματος σε ασθενή με πρωτοπαθή χολική κίρρωση όπως αυτό δίνεται μετά από ανάγνωση του strip από το EUROLineScan. Η πυκνότητα και η ένταση της κάθε ζώνης μετατρέπεται σε σχετικές μονάδες (arbitrary units).

Έμμεσος ανοσοφθορισμός (IF) σε υπόστρωμα HEp2 κυττάρων για την ανίχνευση αντιπυρηνικών αντιγόνων (ANA).

Η ανίχνευση έγινε χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα πλακίδια μονιμοποιημένων κυττάρων HEp2 (INOVA Diagnostics). Αρχικά τοποθετούνται στα πηγάδια (wells) του πλακιδίου τα δείγματα των θετικών και αρνητικών μαρτύρων και των υπό εξέταση ορών σε αραιώσεις 1:80, 1:160 και 1:320 και επωάζονται για 30min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι με ικανοποιητική υγρασία. Στη συνέχεια γίνεται πλύσιμο των πλακιδίων με PBS (δύο φορές για 10 min) και τοποθέτηση, μίας σταγόνας ανά well, αντι-ανθρώπινης IgG συνδεδεμένης με φλουοροσκεΐνη (FITC conjugate), επώαση, στις προαναφερθείσες συνθήκες, για 30min και επανάληψη του πλυσίματος. Τελικά γίνεται εκτίμηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Θετικό θεωρείται το αποτέλεσμα όταν ανιχνεύεται φθορισμός σε αραιώση $\geq 1:80$.

Έμμεσος ανοσοφθορισμός σε υπόστρωμα ιστικών τομών για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι F-ακτίνης.

Η ανίχνευση και περαιτέρω διερεύνηση της παρουσίας των SMA, έγινε χρησιμοποιώντας σαν υπόστρωμα ήπαρ, νεφρό και στομάχι αρουραίων σε εμπορικά διαθέσιμες μονιμοποιημένες τομές (INOVA Diagnostics). Η ανίχνευση αυτή έγινε μόνο στους ασθενείς εκείνους που παρουσίασαν θετική αντιδραστικότητα έναντι ακτίνης με την μέθοδο της ELISA. Αρχικά, για το πείραμα γίνεται τοποθέτηση σε κάθε block ήπατος-νεφρού-στομάχου των δειγμάτων θετικών και αρνητικών μαρτύρων και των υπό εξέταση ορών σε αραιώση σε αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0.15 mol/l, PH 7.4 (PBS), 1:40, 1:80, 1:160 και 1:320. Αφού επωαστούν για 40min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος στο σκοτάδι με ικανοποιητική υγρασία, γίνεται πλύσιμο των πλακών με PBS (τρεις φορές) και κατόπιν, τοποθέτηση της αντι-ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG, που είναι συνδεδεμένη με φλουοροσκεΐνη (FITC conjugate). Γίνεται εκ νέου επώαση για 40min στις

προαναφερθείσες συνθήκες, πλύσιμο (τρεις φορές) και τελικά παρατήρηση των αποτελεσμάτων σε μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού. Θετικό θεωρείται το αποτέλεσμα όταν ανιχνεύεται φθορισμός σε αραίωση $\geq 1:40$.

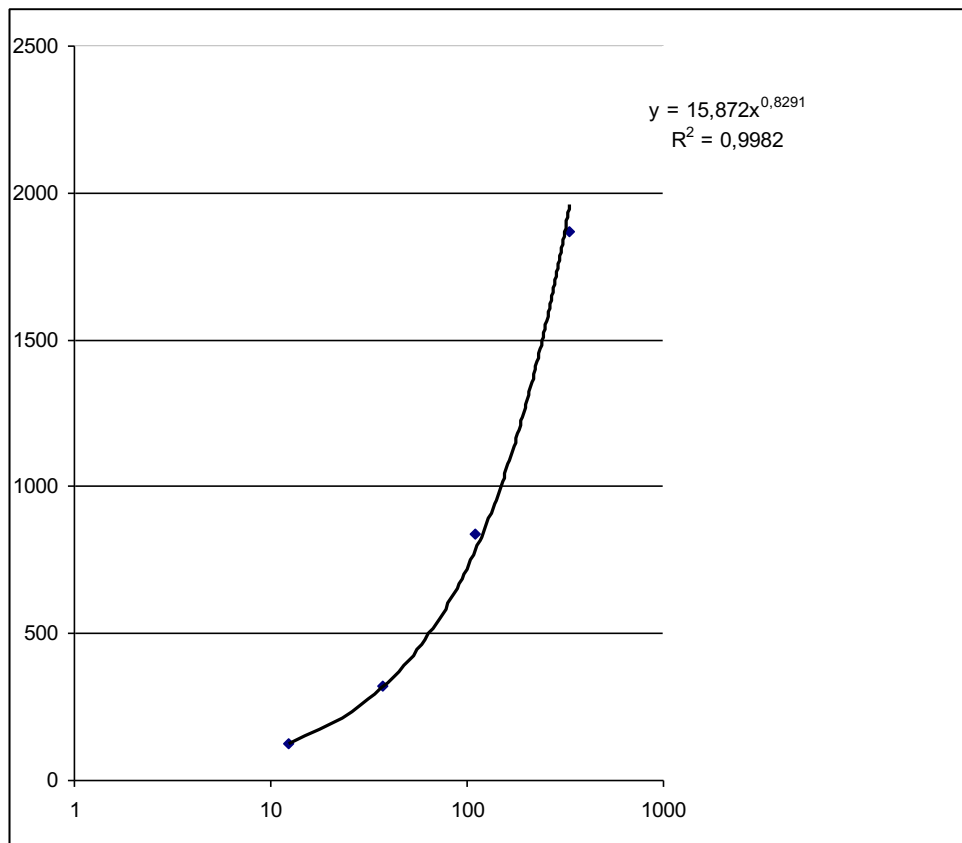
ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι διπλής έλικας DNA (dsDNA).

Τα αντισώματα έναντι dsDNA ανιχνεύθηκαν με εμπορικά διαθέσιμη ELISA (QUANTALite™dsDNAIgG, INOVADiagnostics) και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, στα πηγάδια των πλακιδίων (που έχουν ήδη συνδεδεμένη ποσότητα κεκαθαμένης διπλής έλικας DNA) γίνεται προσθήκη 100μl του κάθε ορού (ασθενούς σε αραίωση 1:101 ή μάρτυρα), εις διπλούν και επώάζονται για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Οι θετικοί μάρτυρες είναι οροί γνωστής συγκέντρωσης (4 μάρτυρες με συγκεντρώσεις 333, 111, 37 και 12,3 SGU-standard anti-dsDNA units) και χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς (standard curve), βάσει της οποίας θα προσδιοριστεί εν συνεχεία ο τίτλος για κάθε ασθενή. Μετά την επώαση γίνεται πλύσιμο 3 φορές με 200μl/πηγάδι ρυθμιστικό διάλυμα (tris-bufferedsaline που περιέχει Tween 20 0,1%) και ακολουθεί προσθήκη 100μl/πηγάδι του δεύτερου αντισώματος συζευγμένου με ένζυμο (HRP IgG-conjugate) και επώαση για 30 min. Μετά το πλύσιμο, ως ανωτέρω, γίνεται επώαση για 30min στο σκοτάδι με 100μl/πηγάδι υποστρώματος-χρωμογόνου (TMB) και ακολουθεί διακοπή της ενζυματικής αντίδρασης με 100μl/πηγάδι διαλύματος θειικού οξέος 0,344M. Τα αποτελέσματα (οπτική πυκνότητα) διαβάζονται στον αναλυτή σε μήκος κύματος 450 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 630nm. Ακολουθεί κατασκευή της καμπύλης αναφοράς με βάσει τις απορροφήσεις των μαρτύρων (Σχήμα 3), και από την εξίσωση ευθείας αυτής προσδιορίζονται οι τιμές των ασθενών εκφραζόμενες ημιποσοτικά σε μονάδες SGU. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή θετικός τίτλος θεωρείται τιμή >75 SGU.

ELISA για την ανίχνευση αντισωμάτων έναντι απλής έλικας DNA (ssDNA) και έναντι ακτίνης.

Τα αντισώματα έναντι ssDNA και ακτίνης ανιχνεύθηκαν με εμπορικά διαθέσιμη ELISA (QUANTALite™dsDNA IgG, INOVA Diagnostics) και ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Και εδώ όπως και στην περίπτωση ανίχνευσης του dsDNA έχουμε πλακίδια που είναι προεπωασμένα με ssDNA και ακτίνη αντίστοιχα. Η πορεία της πειραματικής διαδικασίας είναι ακριβώς η ίδια με την ELISA έναντι dsDNA. Η μόνη διαφορά βάσει οδηγιών του κατασκευαστή είναι ότι εδώ δεν χρησιμοποιούμε πολλά calibrators για το σχεδιασμό της καμπύλης αναφοράς αλλά μόνο 1 γνωστής συγκέντρωσης (86 units για το ssDNA και 25 units για

την ακτίνη). Επομένως ο προσδιορισμός της τελικής συγκέντρωσης ενός άγνωστου δείγματος γίνεται συγκρίνοντας την απορρόφηση του σε σχέση με την απορρόφηση του standard δείγματος (υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης, άρα ακολουθούμε απλή μέθοδο των τριών. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή θετικός τίτλος θεωρείται τιμή >68,6 units για την ssDNA και 20 units για την ακτίνη (80% της τιμής του standard ορού).

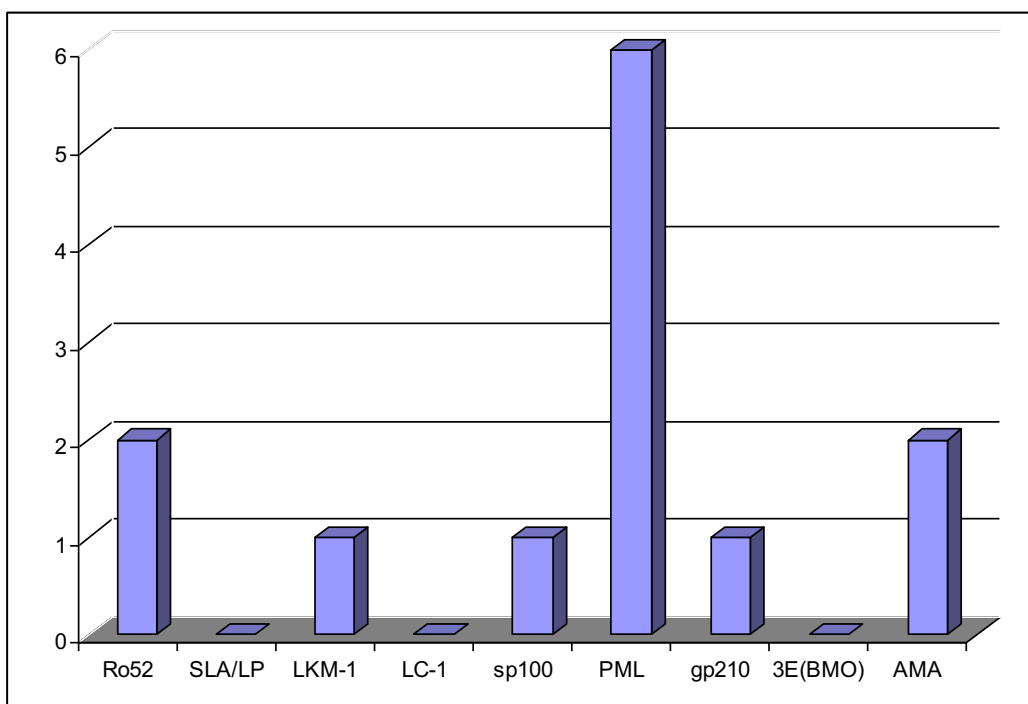


Σχήμα 3 - Καμπύλη αναφοράς (standardcurve) και εξίσωση ευθείας που προκύπτει από τον συσχετισμό των τιμών των απορροφήσεων και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων 4 μαρτύρων βάσει της οποίας εν συνεχεία θα υπολογιστούν οι τίτλοι των αντισωμάτων έναντι dsDNA των ασθενών. Κατακόρυφος άξονας : απορρόφηση, οριζόντιος άξονας : συγκέντρωση (SGU/ml).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Line blot. Από την μέθοδο της αποτύπωσης γραμμής (line blot) για τον προσδιορισμό αντιδραστικότητας έναντι διαφόρων αντιγόνων που σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα του ήπατος διαπιστώθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

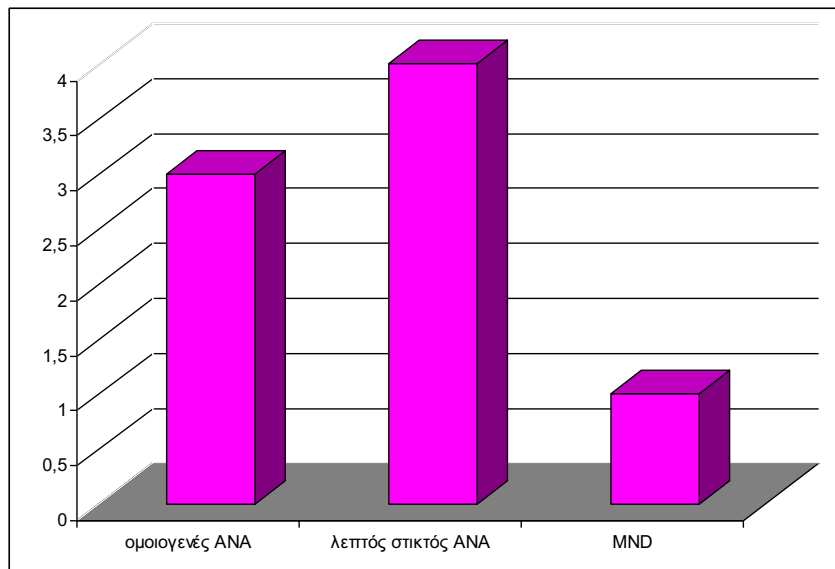
Σε δύο μόνο ασθενείς ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι μιτοχονδρίων (AMA), ενώ αντίθετα δεν ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι του ενισχυμένου υβριδικού αντιγόνου (M2-3E-BMO) που αποτελεί τον κύριο αντιγονικό στόχο των AMA της ΠΧΚ. Σε έναν ασθενή διαπιστώθηκαν αντι-sp100 αντισώματα (πολύ υψηλός τίτλος 65 units) και σε ένα άλλο ασθενή διαπιστώθηκαν αντι-gp210 (μέτριος τίτλος 11 units). Αντισώματα έναντι PML διαπιστώθηκαν συνολικά σε 6 ασθενείς με MS (τίτλοι 11-43 units). Δεν υπήρχε καμία αντιδραστικότητα έναντι των αντιγόνων SLA/LP και LC-1, ενώ διαπιστώθηκε μόνο μια αντιδραστικότητα έναντι LKM-1 αντιγόνου. Τέλος σε 2 μόνο ασθενείς διαπιστώθηκαν αντι-Ro52 αντισώματα σε χαμηλούς τίτλους (11 και 23 units). Σε κανένα ασθενή δεν παρατηρήθηκε διπλή αντιδραστικότητα (σε κανένα δεν ανιχνεύθηκε περισσότερο από 1 αυτοαντίσωμα για αυτοάνοσο νόσημα του ήπατος) (Σχήμα 4).



Σχήμα 4 - Απόλυτος αριθμός αντισωμάτων που ανιχνεύθηκαν σε ασθενείς με ΠΣ

IF. Από την μελέτη με IF χρησιμοποιώντας HEP2 κύτταρα ως υπόστρωμα για την ανίχνευση αντιπυρηνικών αντισωμάτων, είχαμε 8 ασθενείς που είχαν θετικό τίτλο αντισωμάτων >1/160 αραιώση. Από αυτούς, οι 6 είχαν τίτλο 1/160 και οι υπόλοιποι 2 είχαν τίτλο θετικότητα με αραιώση 1/320, οι 3 είχαν τύπο λεπτού στικτού φθορισμού (fine speckled), οι 4 είχαν ομοιογενή πρότυπο (homogenous) ανοσοφθορισμού και ο ένας είχε πρότυπο πολλαπλών πυρηνικών κηλίδων

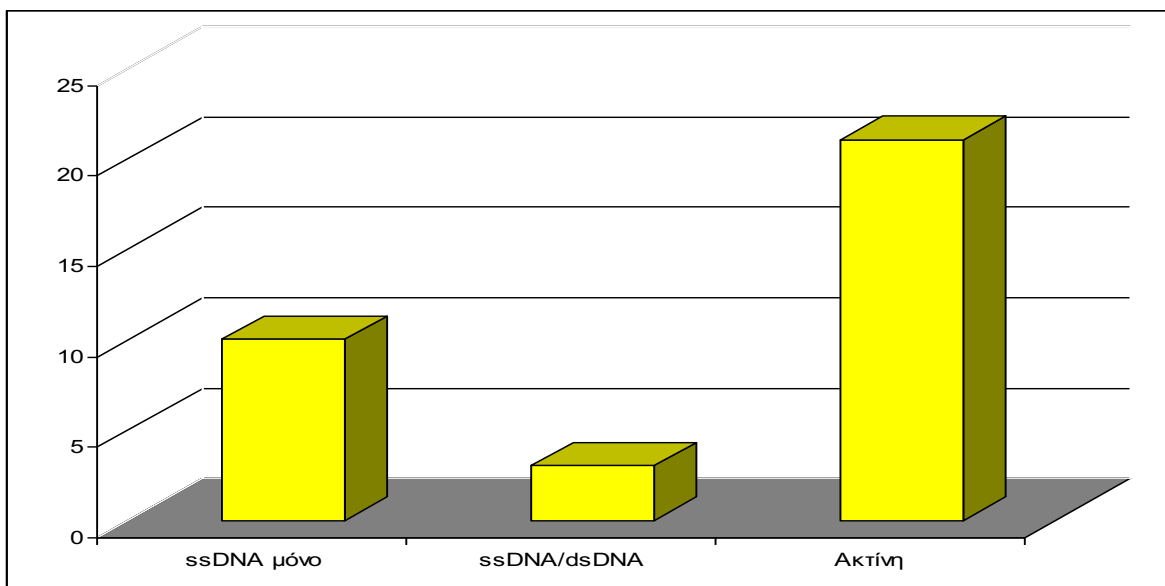
(MND) (στον ασθενή που εμφάνισε αντιδραστικότητα έναντι sp100, επομένως έχουμε συμβατό πρότυπο με ΠΧΚ).



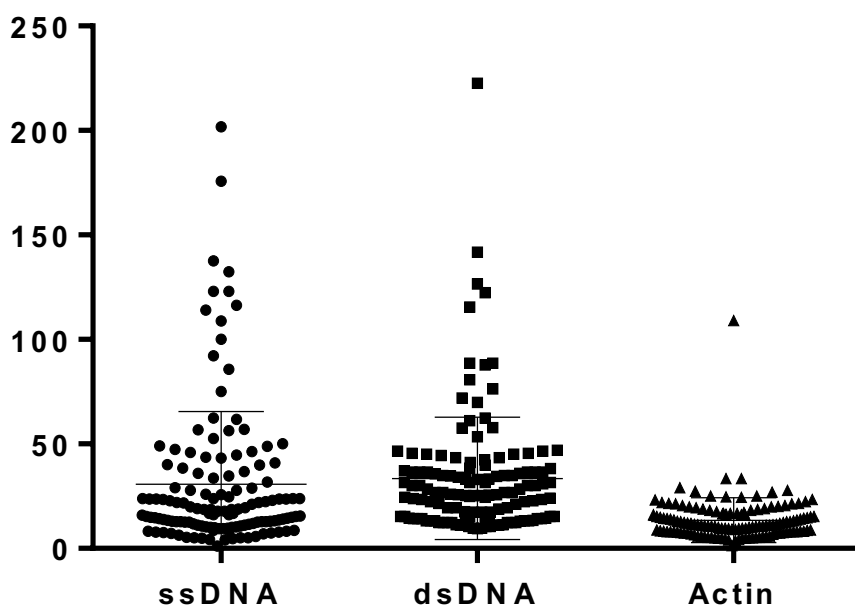
Σχήμα 5 - Οι τρεις μορφές ανοσοφθορισμού θετικών ANA που παρατηρήθηκαν σε μικρό αριθμό (n=8) ατόμων με ΠΣ.

ELISA. Από τον έλεγχο για προσδιορισμό αντισωμάτων έναντι ακτίνης με ELISA διαπιστώθηκαν θετικοί 21 ασθενείς. Η πλειοψηφία τους ήταν πολύ χαμηλής αντιδραστικότητας (21-34 units στους 20 από τους 21 αυτούς ασθενείς με όριο θετικότητας τα 20 units) και μόνο ένας ασθενής είχε σχετικά υψηλά επίπεδα αντισωμάτων (104 units). Όταν έγινε έλεγχος των ασθενών αυτών με μέθοδο έμμεσου ανοσοφθορισμού (IIF) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τομές ήπατος νεφρών και στομάχου αρουραίου, μόνο οι τρεις από τους ασθενείς αυτούς παρουσίασαν αντιδραστικότητα έναντι F-actin (με τίτλους αραιώσεων 1/160, 1/80 και 1/40). Αντίθετα οι περισσότεροι από τους 21 αυτούς ασθενείς είχαν αντιδραστικότητα μόνο τύπου G (φθορισμός σπειραμάτων) ή V (φθορισμός τοιχώματος αγγείων) σε τίτλο αραιώσης που δεν ξεπερνούσε το 1/80 ενώ σε τρεις από τους 21 ασθενείς με θετική ELISA έναντι ακτίνης δεν παρουσίασαν θετικό πρότυπου ανοσοφθορισμού.

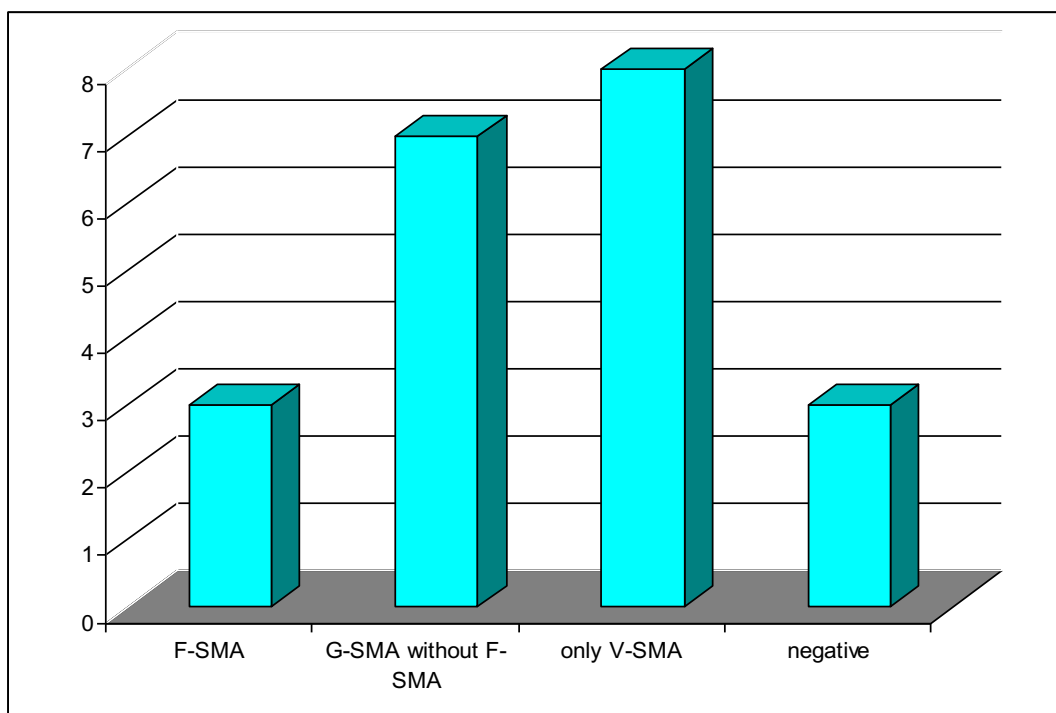
Σε ότι αφορά τον προσδιορισμό με ELISA αντισωμάτων έναντι απλής και διπλής έλικας DNA είχαμε τα παρακάτω αποτελέσματα: 13 ασθενείς ήταν θετικοί για αντισώματα έναντι ssDNA (από 80-201 units με όριο θετικότητας τα 68.6 units), ενώ από αυτούς τους 13, οι τρεις είχαν και αντιδραστικότητα έναντι dsDNA (76-141 units, με όριο θετικότητας τα 75 units). Και οι τρεις ασθενείς με διπλή ssDNA/dsDNA αντιδραστικότητα είχαν θετικά αντιπυρηνικά αντισώματα.



Σχήμα 6 - Αποτελέσματα ELISA και αριθμός ασθενών που ανιχνεύθηκαν αντισώματα έναντι ssDNA (χωρίς dsDNA), διπλή αντιδραστικότητα ssDNA/dsDNA και έναντι ακτίνης.



Σχήμα 7 - Συγκεντρωτικά αποτελέσματα σε units των αντισωμάτων έναντι ssDNA, dsDNA και ακτίνης σε ασθενείς με ΠΣ. Οι οριζόντιες γραμμές δείχνουν την μέση τιμή και τυπική απόκλιση για κάθε αυτοαντίσωμα.



Σχήμα 8 - Πρότυπο ανοσοφθορισμού σε τομές ήπατος/νεφρού/στομάχου αρουραίων των 21 ασθενών με ΠΣ που είχαν θετικό τίτλο αντισωμάτων για ακτίνη με ELISA. Από αυτούς μόνο οι 3 είχαν ανιχνεύσιμη την F-SMA μορφή που είναι ειδική για την ΑΗ αλλά σε χαμηλούς τίτλους (συνγχρόνως είχαν και G/T μορφή). Επτά ασθενείς είχαν ανιχνεύσιμη μόνο την G-SMA μορφή (με ή χωρίς V-SMA αλλά σίγουρα χωρίς F-SMA). Οκτώ ασθενείς είχαν μόνο V-SMA αντισώματα ενώ τρεις ήταν τελείως αρνητικοί. Ο μεγαλύτερος τίτλος που ανιχνεύθηκε ήταν 1/80.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν τη σχεδόν αμελητέα συχνότητα ΑΗ σε ασθενείς με ΠΣ (0,17%, ένα ποσοστό που φαίνεται να μην διαφέρει από εκείνο στον γενικό πληθυσμό [38]. Από ότι φαίνεται το ποσοστό εμφάνισης ΑΗ δεν διαφέρει σε δημογραφικά συγκρίσιμους πληθυσμούς ΠΣ και υγείων μαρτύρων [39]. Από άλλες βιβλιογραφικές αναφορές φαίνεται ότι η συχνότητα συνύπαρξης ΑΗ και ΠΣ κυμαίνεται στο 0,06-0,2% των ασθενών με ΠΣ [40,41]. Με βάσει τα παραπάνω, τα ποσοστά αυτοαντισωμάτων του ήπατος που σχετίζονται με ΑΗ-1 ή ΑΗ-2 αναμένονται από μικρά ως πολύ μικρά ως αμελητέα. Πράγματι τα δεδομένα της μελέτης μας με ΠΣ ασθενείς από την κεντρική Ελλάδα επιβεβαιώνουν την πολύ μικρή συχνότητα ασθενών με ΠΣ στους οποίους ανιχνεύονται ηπατικά αυτοαντισώματα της ΑΗ (ταυτόχρονη ανίχνευση τόσο με μοριακές μεθόδους όσο και με ΕΑΦ). Η πιο σπάνια μορφή της αυτοάνοσης ηπατίτιδας είναι η ΑΗ-2 που παρατηρείται κυρίως σε κορίτσια ηλικίας από 0-15 ετών. Λόγω της γεω-επιδημολογίας του νοσήματος και της πολύ σπάνιας εμφάνισης της, η ανίχνευση ηπατικών αυτοαντισωμάτων ΑΗ-2 έναντι των LKM-1 και LC-1 αναμένεται εξαιρετικά σπάνια έως μηδαμινή σε ασθενείς με ΠΣ. Τα δεδομένα μας επιβεβαιώνουν τα αναμενόμενα. Δεν υπήρχε καμία αντιδραστικότητα έναντι του αυτοαντιγόνου του LC-1, ενώ διαπιστώθηκε μόνο μία αντιδραστικότητα έναντι LKM-1 αντιγόνου σε χαμηλό τίτλο. Ωστόσο, η ασθενής με ΠΣ και anti-LKM-1 δεν πάσχει από αυτοάνοση ηπατίτιδα και μελέτη του ιατρικού της φακέλου δεν αναδεικνύει εργαστηριακά ή κλινικά ευρήματα συμβατά με ΑΗ-2. Η μόνη άλλη πάθηση στην οποία μπορεί να ανιχνεύονται anti-LKM-1 χωρίς να υπάρχει ΑΗ-2, είναι ή χρόνια ηπατίτιδα C. Οι ιολογικές εξετάσεις της ασθενούς είναι αρνητικές για ηπατίτιδα C. Η πιθανότητα να συνυπάρχουν σε ασθενή με ΠΣ anti-LKM-1 αντισώματα και αυτά να αποτελούν πρόωμο δείκτη μελλοντικής ανάπτυξης ΑΗ-2 δεν μπορεί να αποκλειστεί αλλά θεωρείται εξαιρετικά απίθανη, μια και το νόσημα προσβάλλει παιδιά και νεαρά κορίτσια και θα έπρεπε λογικά να έχει εκδηλωθεί. Λόγω του μικρού τίτλου του αυτοαντισώματος, το πιο πιθανό σενάριο είναι η εμφάνισή του να είναι επιφανινόμιο χωρίς κλινική προγνωστική αξία, κάτι που θα διερευνηθεί προοπτικά σε μελλοντικά δείγματα από τον ίδιο ασθενή. Αν και δε μπορέσαμε να το συσχετίσουμε, πιθανό είναι επίσης η εμφάνιση του αντισώματος να σχετίζεται με φάρμακα που μεταβολίζονται από το κυτόχρωμα P450 IID6, που μπορούν σε σπάνιες περιπτώσεις να οδηγήσουν στην ανάπτυξη νεοεπιτόπων και σχετικών αυτοαντισωμάτων.

Κατά της συνυπάρχουσας ΑΗ σε ασθενείς με ΠΣ είναι και η παντελής έλλειψη anti-SLA αντισωμάτων. Τα μόνα άλλα αυτοαντισώματα που σχετίζονται με την ΑΗ, κυρίως τύπου 1, είναι τα ANA και τα SMA που σχετίζονται με συγκεκριμένα αυτοαντιγόνα ή με συγκεκριμένα μοτίβα στον ΕΑΦ. Τα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι πολλοί οροί ασθενών με ΠΣ έχουν SMA με ΕΑΦ, ωστόσο αυτά δεν είναι τα χαρακτηριστικά SMA ακτίνης που ανευρίσκονται σε ασθενείς με ΑΗ-

1. Αξιίζει να σημειωθεί ότι ενώ 21 ασθενείς με ΠΣ είχαν (σε μικρούς τίτλους πλην ενός) αντισώματα έναντι ακτίνης με ELISA, μόνο οι τρεις από τους ασθενείς αυτούς παρουσίασαν αντιδραστικότητα έναντι F-actin (1 με τίτλο 1/160, οι άλλοι δυο με μικρότερο τίτλο). Η ερμηνεία των δεδομένων είναι διπλή. Πρώτον, τεστ F-ακτίνης με ELISA σε ασθενείς με ΠΣ μπορεί να οδηγήσουν σε μεγάλο ποσοστό θετικότητας χωρίς ωστόσο να υπάρχει άμεση συσχέτιση με πιθανή ΑΗ-1. Αυτό θα πρέπει να το γνωρίζει ο θεράπων νευρολόγος γι' αυτό τα αποτελέσματα του ανοσολογικού ελέγχου μπορεί να οδηγήσουν σε πλήρη σύγχυση. Βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η συγκεκριμένη ELISA (που είναι και η μοναδική που κυκλοφορεί στο εμπόριο) έχει μη ικανοποιητική ειδικότητα (<85%) κυρίως σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα άσχετα με την ΑΗ. Απ' ότι φαίνεται μόνο οροί με υψηλούς τίτλους και ταυτόχρονη ανίχνευση SMA με ΕΑΦ θα πρέπει να αξιολογούνται/ελέγχονται περισσότερο, όπως ο ένας ασθενής που ανευρέθη στη μελέτη μας με 104 units αντιδραστικότητα F-actin στην ELISA (αλλά αρνητικά SMA F-ακτίνης με ΕΑΦ).

Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφερθεί στην ανίχνευση ANA σε ασθενείς με ΠΣ. η δική μας εστίασε σε εκείνα τα ANA που κυρίως σχετίζονται με ΑΗ-1, δηλαδή αυτά που δίνουν ομοιογενές πρότυπο με τον ΕΑΦ και συνήθως αντιδρούν με το dsDNA (και ταυτόχρονα με το ssDNA). Να σημειωθεί ότι ο γενικός κανόνας είναι αντισώματα κατά του dsDNA να αντιδρούν με ssDNA αλλά όχι απαραίτητα το αντίστροφο. Θα πρέπει να γίνει κατανοητό ότι αντισώματα έναντι του ssDNA είναι ανιχνεύσιμα στην ΠΣ και η παθοφυσιολογική τους σημασία πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Για παράδειγμα μπορεί να σχετίζονται με την συνύπαρξη νοσημάτων κολλαγόνου ή άλλα μη οργανοειδικά αυτοάνοσα νοσήματα που συνυπάρχουν με την ΠΣ. Από τους ασθενείς μας, 13 ήταν θετικοί για αντισώματα έναντι ssDNA (από 80-201 units), δηλαδή με τίτλους σχετικά μικρούς που μπορεί να θεωρηθούν και άνευ κλινικής σημασίας αν δεν συνυπάρχουν κλινικοεργαστηριακά ευρήματα που να εγείρουν διαφοροδιαγνωστικά προβλήματα. Από αυτούς τους 13, οι τρεις είχαν και αντιδραστικότητα έναντι dsDNA (76-141 units, με όριο θετικότητας τα 75 units) και ANA με ΕΑΦ. Στη μελέτη μας δεν μπορέσαμε να συσχετίσουμε την ύπαρξη των dsDNA αντισωμάτων με ΑΙΗ ή με αυτοάνοσα ρευματικά νοσήματα όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος.

Τέλος, δυο περαιτέρω σχόλια πρέπει να γίνουν για τα ηπατικά αυτοαντισώματα που σχετίζονται με ΠΧΚ και μελετήθηκαν στην έρευνα μας. Η συχνότητα εμφάνισης της ΠΧΚ σε ΠΣ κυμαίνεται από μηδέν έως 0,12% [39,43,44]. Πρακτικά 1 άρρωστη για κάθε 100 με ΠΣ έχει συνυπάρχουσα ΠΧΚ. Στη μελέτη μας, AMA ανιχνεύθηκαν σε, 2 ασθενείς αλλά σε κανέναν από αυτούς δεν συνυπήρχαν αντισώματα κατά του ΠΧΚ-ειδικού αυτοαντιγόνου των AMA αμφισβητώντας έμμεσα πλην σοβαρά την κλινική σημασία του ευρήματος. Σε έναν ασθενή διαπιστώθηκαν αντι-sp100 MND ANA (πολύ υψηλός τίτλος 65 units) και σε ένα άλλο ασθενή

διαπιστώθηκαν αντι-grp210 με οριακό τίτλο. Επειδή τα αυτοαντισώματα της ΠΧΚ συνυπάρχουν πολλά χρόνια πριν την εμφάνιση της νόσου καλό θα ήταν εάν δεν υπάρχει κλινικοεργαστηριακή απόδειξη της χολοστατικής νόσου, οι ασθενείς αυτοί να γνωρίζουν ότι από καιρό σε καιρό θα πρέπει να υποβάλλονται σε απλές εργαστηριακές εξετάσεις και επί συμπτωμάτων να τίθεται το ερώτημα πιθανής διάγνωσης συνυπάρχουσας ΠΧΚ. Ενδελεχής έλεγχος των ιατρικών φακέλων όλων των αρρώστων με θετικά ηπατικά αυτοαντισώματα θα αναδείξει την κλινική και διαγνωστική τους αξία.

Συνοπτικά, η συνύπαρξη αυτοάνοσων νοσημάτων του ήπατος και ΠΣ είναι πολύ σπάνια. Ηπατικά αυτοαντισώματα που σχετίζονται με ΑΗ και ΠΧΚ ανιχνεύονται στην ΠΣ αλλά με μικρές εξαιρέσεις είναι σε πολύ μικρούς τίτλους και η παρουσία τους μάλλον μπερδεύει παρά βοηθά τον θεράποντα ιατρό. Ωστόσο, η παρουσία τους δε μπορεί να αμφισβητηθεί και ο ιατρός πρέπει να υποψιάζεται την ύπαρξη αυτοάνοσων ηπατικών νοσημάτων σε ασθενείς με συνυπάρχουσα σημειολογία. Τα δεδομένα μας δε φαίνεται να υποστηρίζουν τη διενέργεια ελέγχου ρουτίνας για ηπατικά αυτοαντισώματα σε όλους τους ασθενείς με ΠΣ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Lünemann JD, Kamradt T, Martin R, Münz C. Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *Journal of Virology*. American Society for Microbiology; 2007 Jul;81(13):6777–84.
2. Ascherio A. Epstein–Barr virus in the development of multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*. Taylor & Francis; 2014 Jan 9;8(3):331–3.
3. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature*. Nature Publishing Group; 1995 Sep 14;377(6545):150–1.
4. Young IR, Hall AS, Pallis CA, Bydder GM, Legg NJ, Steiner RE. NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE IMAGING OF THE BRAIN IN MULTIPLE SCLEROSIS. *The Lancet*. Elsevier; 1981 Nov;318(8255):1063–6.
5. Miller H, Newell DJ, Ridley A. MULTIPLE SCLEROSIS. *The Lancet*. Elsevier; 1961 Jan;277(7169):127–9.
6. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet*. Elsevier; 2008 Oct;372(9648):1502–17.
7. Msif. Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. Multiple Sclerosis International Federation; 2013, 1-28.
8. Lublin FD, Reingold SC, National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis*. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology*. Lippincott Williams & Wilkins; 1996 Apr 1;46(4):907–11.
9. The Lancet Neurology. Setting new standards in multiple sclerosis care and research. *The Lancet Neurology*. Elsevier; 2012 Oct;11(10):835.
10. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H-P, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. John Wiley & Sons, Inc; 2001;50(1):121–7.
11. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Annals of Neurology*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2005;58(6):840–6.
12. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2011 Mar 8;69(2):292–302.
13. CHAMPS Study Group. MRI predictors of early conversion to clinically definite MS in the CHAMPS placebo group. *Neurology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2002 Oct 8;59(7):998–1005.

-
14. Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJL, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell. Elsevier*; 2015 Jan 15;160(1-2):37–47.
 15. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology*. 2015 Mar;14(3):263–73.
 16. Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature Reviews Immunology*. 2009 Apr;9(4):246–58.
 17. Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2001 Jul 15;108(2):311–8.
 18. Ji Q, Perchellet A, Goverman JM. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8⁺ T cells expressing dual TCRs. *Nature Immunology*. 2010 Jun 6;11(7):628–34.
 19. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*. 2012 Aug 20;12(9):623–35.
 20. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015 Jun 1;523(7560):337–41.
 21. Heneka MT, Kummer MP, Latz E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*. 2014 Jun 25;14(7):463–77.
 22. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature Genetics*. 2013 Sep 29;45(11):1353–60.
 23. Gregory AP, Dendrou CA, Attfield KE, Haghikia A, Xifara DK, Butter F, et al. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature*. 2012 Jul 8;488(7412):508–11.
 24. Menche J, Sharma A, Kitsak M, Ghiassian SD, Vidal M, Loscalzo J, et al. Disease networks. Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2015 Feb 20;347(6224):1257601–1.
 25. Taşan M, Musso G, Hao T, Vidal M, MacRae CA, Roth FP. Selecting causal genes from genome-wide association studies via functionally coherent subnetworks. *Nature Methods*. 2014 Dec 22;12(2):154–9.
 26. Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. *Nature Research*; 2015 Feb 18;518(7539):317–30.
 27. Raj T, Rothamel K, Mostafavi S, Ye C, Lee MN, Replogle JM, et al. Polarization of the effects of autoimmune and neurodegenerative risk alleles in leukocytes. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2014 May 2;344(6183):519–23.
 28. Roederer M, Quaye L, Mangino M, Beddall MH, Mahnke Y, Chattopadhyay P, et al. The genetic architecture of the human immune system: a bioresource for autoimmunity and disease pathogenesis. *Cell*. Elsevier; 2015 Apr 9;161(2):387–403.

-
29. Hedström AK, Åkerstedt T, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Shift work at young age is associated with increased risk for multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2011 Oct 17;70(5):733–41.
 30. Behan PO, Geschwind N, Lamarche JB, Lisak RP, Kies MW. DELAYED HYPERSENSITIVITY TO ENCEPHALITOGENIC PROTEIN IN DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS. *The Lancet*. 1968 Nov;292(7576):1009–12.
 31. Behan PO, Kies MW, Lisak RP, Sheremata W, Lamarche JB. Immunologic Mechanisms in Experimental Encephalomyelitis in Nonhuman Primates. *Archives of Neurology*. American Medical Association; 1973 Jul 1;29(1):4–9.
 32. Marrie RA, Horwitz RI, Cutter G, Tyry T, Vollmer T. Smokers with Multiple Sclerosis Are More Likely to Report Comorbid Autoimmune Diseases. *Neuroepidemiology*. 2011;36(2):85–90.
 33. Somers EC, Thomas SL, Smeeth L, Hall AJ. Autoimmune Diseases Co-occurring Within Individuals and Within Families. *Epidemiology*. 2006 Mar;17(2):202–17.
 34. Steinman L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005 Jun;4(6):510–8.
 35. Steinman L, Merrill JT, McInnes IB, Peakman M. Optimization of current and future therapy for autoimmune diseases. *Nature Medicine*. 2012 Jan 6;18(1):59–65.
 36. Berkovich R, Subhani D, Steinman L. Autoimmune Comorbid Conditions in Multiple Sclerosis. *US Neurology*. 2011;07(02):132.
 37. Marrie RA, Reider N, Cohen J, Stuve O, Sorensen PS, Cutter G, et al. A systematic review of the incidence and prevalence of autoimmune disease in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. SAGE Publications; 2015 Mar 2;21(3):282–93.
 38. de Seze J, Canva-Delcambre V, Fajardy I, Delalande S, Stojkovic T, Godet E, et al. Autoimmune hepatitis and multiple sclerosis: a coincidental association? *Multiple Sclerosis Journal*. SAGE Publications; 2005 Dec;11(6):691–3.
 39. Langer-Gould A, Albers KB, Van Den Eeden SK, Nelson LM. Autoimmune diseases prior to the diagnosis of multiple sclerosis: a population-based case-control study. *Mult Scler*. SAGE Publications; 2010 Jul;16(7):855–61.
 40. Deltenre P, Peny M-O, Dufour A, Nady ME, Henrion J. Acute hepatitis induced by glatiramer acetate. *Case Reports*. BMJ Publishing Group Ltd; 2009;2009(feb26 1):bcr0920080913–3.
 41. Von Kalckreuth V, Lohse AW, Schramm C. Unmasking Autoimmune Hepatitis Under Immunomodulatory Treatment of Multiple Sclerosis-not only Beta Interferon. *The American Journal of Gastroenterology*. 2008 Aug;103(8):2147–8.

-
42. Nielsen N, Frisch M, Rostgaard K, Wohlfahrt J, Hjalgrim H, Koch-Henriksen N, et al. Autoimmune diseases in patients with multiple sclerosis and their first-degree relatives: a nationwide cohort study in Denmark. *Multiple Sclerosis Journal*. SAGE Publications; 2008 Jul 1;14(6):823–9.
 43. Henderson RD, Bain CJ, Pender MP. The occurrence of autoimmune diseases in patients with multiple sclerosis and their families. *J Clin Neurosci*. Elsevier; 2000 Sep;7(5):434–7.
 44. Seyfert S, Klapps P, Meisel C, Fischer T, Junghan U. Multiple sclerosis and other immunologic diseases. *Acta Neurologica Scandinavica*. Blackwell Publishing Ltd; 2009 Jan 29;81(1):37–42.
 45. Gatselis NK. Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: Etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(1):60.
 46. Liberal R, Vergani D, Mieli-Vergani D. Update on Autoimmune Hepatitis. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2015 Mar;3(1):42-52.
 47. Manns MP, Lohse AW, Vergani D. Autoimmune hepatitis--Update 2015. *Journal of Hepatology*. Elsevier; 2015 Apr;62(1 Suppl):S100–11.
 48. Bogdanos D, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoantibodies and their Antigens in Autoimmune Hepatitis. *Seminars in Liver Disease*. © Thieme Medical Publishers; 2009 Aug 12;29(03):241–53.
 49. Liaskos C, Bogdanos D-P, Davies ET, Dalekos GN. Diagnostic relevance of anti-filamentous actin antibodies in autoimmune hepatitis. *Journal of Clinical Pathology*. BMJ Publishing Group Ltd and Association of Clinical Pathologists; 2007 Jan;60(1):107–8.
 50. Strassburg CP, Manns MP. Autoantibodies and Autoantigens in Autoimmune Hepatitis. Berk PD, Michael P Manns P, editors. *Seminars in Liver Disease*. Copyright © 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. Tel.: +1(212) 584-4662; 2002;22(4):339–52.
 51. Jepsen P, Grnbæk L, Vilstrup H. Worldwide Incidence of Autoimmune Liver Disease. *Digestive Diseases*. 2015 Dec 8;33(2):2–12.
 52. Marzorati S, Invernizzi P, Lleo A. Making Sense of Autoantibodies in Cholestatic Liver Diseases. *Clinics in Liver Disease*. 2016 Feb;20(1):33–46.
 53. Nakamura M. Clinical Significance of Autoantibodies in Primary Biliary Cirrhosis. *Seminars in Liver Disease*. Thieme Medical Publishers; 2014 Jul 24;34(03):334–40.
 54. Dähnrich C, Pares A, Caballeria L, Rosemann A, Schlumberger W, Probst C, et al. New ELISA for detecting primary biliary cirrhosis-specific antimitochondrial antibodies. *Clinical Chemistry*. Clinical Chemistry; 2009 May;55(5):978–85.
 55. Bogdanos DP, Komorowski L. Disease-specific autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *Clinica Chimica Acta*. 2011 Mar;412(7-8):502–12.
 56. Mytilinaiou MG, Meyer W, Scheper T, Rigopoulou EI, Probst C, Koutsoumpas AL, et al. Diagnostic

and clinical utility of antibodies against the nuclear body promyelocytic leukaemia and Sp100 antigens in patients with primary biliary cirrhosis. *Clinica Chimica Acta*. 2012 Aug;413(15-16):1211–6.

57. de Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a novel transcribed locus. *Nature*. Nature Publishing Group; 1990 Oct 11;347(6293):558–61.
58. Szostecki C, Will H, Netter H.J, Guldner H.H. Autoantibodies to the Nuclear Sp100 Protein in Primary Biliary Cirrhosis and Associated Diseases: Epitope Specificity and Immunoglobulin Class Distribution. *Scandinavian Journal of Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 1992 Oct;36(4):555–64.